

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-504610

(43) 公表日 平成9年(1997)5月6日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
G 0 1 N 33/543	5 9 5	0276-2J	G 0 1 N 33/543 5 9 5
G 0 6 T 7/00		0273-2J	21/84 Z
// G 0 1 N 21/84		8625-5H	G 0 6 F 15/62 3 9 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全108頁)

(21) 出願番号 特願平7-511848
(86) (22) 出願日 平成6年(1994)9月28日
(85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)4月22日
(86) 国際出願番号 PCT/US94/11015
(87) 国際公開番号 WO95/11454
(87) 国際公開日 平成7年(1995)4月27日
(31) 優先権主張番号 08/140, 383
(32) 優先日 1993年10月21日
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP

(71) 出願人 アボット・ラボラトリーズ
アメリカ合衆国、イリノイ・60064-3500、
アボット・パーク、アボット・パーク・ロ
ード・100、チャド・0377/エイ・ピー・
6・デュー2
(72) 発明者 ゴードン, ジュリアン
アメリカ合衆国、イリノイ・60044、レイ
ク・ブラフ、イースト・シエリダン・ロー
ード・307
(74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的リガンドの検出装置及び方法

(57) 【要約】

核酸などのリガンドを増幅及び検出する方法、デバイス、装置及びキットが提供される。装置は、密封反応/検出ユニットと協働し得る2段式熱サイクリングデバイスであり得る。デバイスの反応チャンバーにサンプルを加えた後、反応チャンバーを検出チャンバーと結合して反応/検出ユニットを形成する。反応混合物は加熱エレメントと流体の膨張によって検出チャンバーに移送され得る。標的リガンドは検出チャンバー内で担体上に所定のアレー状に固定される。装置に連結したビデオ画像形成システムは固定されたリガンドを検出及び分析する。画像を読み取り、デジタル化し、統計分析して画像形成方法の精度を改善する。

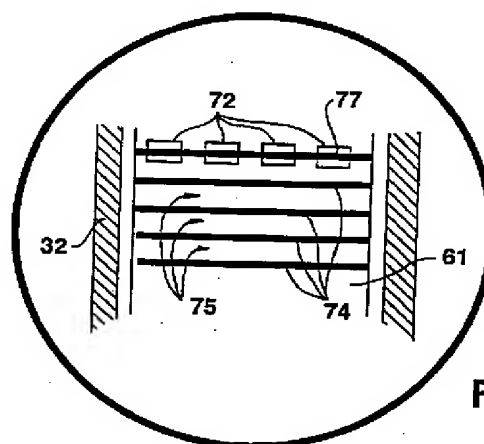


Fig. 12A

【特許請求の範囲】

1. 各々同一分析物に対して特異的であり且つ各々シグナル領域以外に非シグナル領域を含む複数の複製物捕獲部位と、分析物の存在又は量を表す検出可能なシグナルを前記複製物部位のシグナル領域で発生する手段とを含む固体担体を準備、する段階と、

標的分析物を含む疑いのある反応サンプルに前記担体を露出し、分析物が存在する場合には検出可能なシグナルを前記複製物部位で発生する段階と、

前記複製物捕獲部位のビデオ画像を生成する段階と、

前記複製物部位の各々について前記ビデオ画像のデジタル表現を生成し、前記デジタル表現をコンピュータメモリに記憶させる段階と、

前記デジタル表現を分析し、前記検出可能

なシグナルが分析物の存在又は量の尺度として存在するか否かを判定する段階とを備えているアッセイ反応結果の分析方法。

2. 前記分析する段階が、少なくとも一つの複製物部位のデジタル表現を少なくとも一つの他の複製物部位のデジタル表現と比較し、前記分析物に高信頼性の結果を提供する段階を備えている請求項1に記載の方法。

3. 前記分析する段階が、少なくとも一つの複製物部位のデジタル表現を前記分析物の他の各複製物部位のデジタル表現と比較する段階を備えている請求項2に記載の方法。

4. 前記比較する段階が、前記信号をバックグラウンド信号値に対して正規化する段階を備えている請求項2に記載の方法。

5. 前記比較する段階が、前記複製物部位のデジタル表現の平均を計算する段階を備えている請求項2に記載の方法。

6. 前記比較する段階が、前記複製物部位の

デジタル表現の標準偏差を計算する段階を備えている請求項5に記載の方法。

7. 前記比較する段階が、前記複製物部位のデジタル表現の標準偏差を計算する段階を備えている請求項3に記載の方法。

8. 前記デジタル表現が複数の走査線と該走査線の各々のための複数の画素を含む請求項1に記載の方法。

9. 前記走査線の任意のものが前記走査線の他と統計的に相違するか否かを判定する段階を更に備えている請求項8に記載の方法。

10. 前記デジタル表現が各画素に数値を割り当てると共に前記走査線の任意のものが前記走査線の他と統計的に相違するか否かを判定する前記段階が、各走査線の画素平均と標準偏差を計算し、各走査線の計算値を比較することにより実施される請求項9に記載の方法。

11. 前記分析する段階が、複製物部位の二

つ以上についてシグナル領域の画素値を比較する段階を備えている請求項8に記載の方法。

12. 前記比較する段階が、複製物部位の少なくとも二つのシグナル領域の画素平均と標準偏差を計算する段階を備えている請求項11に記載の方法。

13. 任意のシグナル領域が他の複製物部位のシグナル領域と統計的に相違するか否かを判定する段階を更に備えている請求項11に記載の方法。

14. 任意の複製物部位のシグナル領域が統計的に異常であるか否かを判定する段階と、結果の判定前にこのような異常複製物部位の画素平均及び標準偏差データを廃棄する段階を更に備えている請求項13に記載の方法。

15. 検出可能なシグナルをもつ前記複製物捕獲部位内のシグナル領域の外周を識別するために輪郭強調を使用する段階を更に備えて

いる請求項1に記載の方法。

16. 前記複製物シグナル領域が連続又は不連続直線アレー状である請求項1に記載の方法。

17. 前記複製物シグナル領域がほぼ円形である請求項1に記載の方法。

18. 担体が該担体上の複製物部位の構成に関する光学コード化情報を更に備えており、前記情報がビデオ画像に含まれ、デジタル表現を生成する段階の前に分析される請求項1に記載の方法。

19. 担体が分析物の存在に関係なく検出可能なシグナルを含む対照ゾーンを担体上に更に備えており、前記対照ゾーンがビデオ画像に含まれ、複数の複製物部位を整列させるための基準点として使用される請求項1に記載の方法。

20. 担体が個々の分析物毎に少なくとも二つの捕獲部位を更に備えており、該部位が各

々分析物のただ一つに対して特異的な複数の複製物部位を含む請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**標的リガンドの検出装置及び方法****発明の分野**

本発明は一般には標的リガンドの検出に関し、特に画像処理技術を使用して増幅標的核酸を検出する装置及び方法に関する。

発明の背景

核酸の増幅は種々の用途で有用である。例えば、核酸増幅法はクローニング及び配列決定の目的で臨床診断やDNA及びRNAの型別及び定量に用いられている。

核酸増幅反応を実施するための装置は一般に熱サイクリングデバイス又はサーマルサイクラーとして知られている。このようなデバイスの1例は公開PCT出願WO 92/20778に記載されている。このPCT出願のサイクリングデバイスは種々の方法でDNA

増幅を実施するのに有用である。WO 92/20778に記載されているデバイスはサンプルを収容するピペット先端を受容するための複数のウェルを備えるリング形ホルダーを含む。サンプルは各先端の開放端をヒートシールすることにより先端の内側に収容される。リングを加熱及び冷却する手段を設け、デバイスがピペット先端に収容されたサンプルを周期的に加熱及び冷却できるようにする。リングを冷却する手段は、リングに冷風を吹き付けるファンと、リングから内側径方向に配置され、リングに冷風を吹き付けるのを助長する冷却フィンを含む。PCT出願WO 92/20778の開示内容全体は参考資料として本発明の一部とする。

核酸配列増幅法は当業者に公知である。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法は「プライマー」と呼ばれる1対のオリゴヌクレオチド配列と熱サイクリング法を使用し、

変性、アニーリング及びプライマー伸長の1サイクルで対象の標的核酸を倍増する。PCR増幅は米国特許第4,683,195号及び米国特許第4,683,

202号に詳細に記載されている。これらの2件の特許の開示内容全体は参考資料として本発明の一部とする。

核酸配列を増幅する別の公知方法はリガーゼ連鎖反応（LCR）である。LCRでは、PCRで使用するプライマーの代わりに2個の一次プローブと2個の二次プローブを使用する。ハイブリダイゼーションと連結のサイクルを繰り返すことにより、標的の増幅が達せられる。連結増幅産物は対象の標的核酸又はその相補体と機能的に等価である。この方法はEP-A-320308に記載され、次いで、EP-A-336-731、WO89/09835、WO89/12696及びBarany, Proc. Natl. Acad.

Sci., 88:189-193 (1991)に記載された。LCRの変法はEP-A-439-182及びWO90/01069に記載されている。

等温反応を利用した核酸増幅法も知られている。このような反応の例としては、3SR（自己持続配列複製）[E. Fahy, D. Y. Kwoh & T. R. Gingeras, PCR Methods and Applications 1:25 (1991)] や、SDA（鎖置換増幅）[G. T. Walker, M. C. Little, J. G. Nadeau & D. D. Shank, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 89:392 (1992)] がある。

このような方法を使用する核酸増幅は通常は、WO92/20778に開示されているようなスナップトップバイアルやシーラブル

ピペットなどの密閉反応容器内で実施される。増幅反応の完了後、反応容器を開き、標準検出法を用いる検出装置に増幅産物を移す。

典型的には、2本鎖増幅産物を変性させ、検出可能な標識と結合した1個以上のハイブリダイジングプローブで変性鎖を処理することにより増幅産物を検出する。通常は、ハイブリダイズしなかった標識プローブをハイブリダイズした標識プローブから分離しなければならず、このためには付加的分離段階が必要である。他の検出法では、臭化エチジウムで染色したゲルによって増幅産物を検出する

ことができる。例えば、³²P追跡、エンザイムイムノアッセイ [Kellerら, J. Clin. Microbiology, 28:1411-6 (1990)]、蛍光 [Urdeaら, Nucleic Acids Research, 16:4937-56 (1988); Smithら, Nucleic

Acids Research, 13:2399-412 (1985)]、及び化学発光アッセイなどを不均一系 [BornsteinとVoyta, Clin. Chem., 35:1856-57 (1989); Bornsteinら, Anal. Biochem., 180:95-98 (1989); Tizardら, Proc. Natl. Acad. Sci., 78:4515-18 (1990)]又は均一系 [Arnoldら, 米国特許第4,950,613号; Arnoldら, Clin. Chem., 35:1588-1589 (1989); NelsonとKacian, Clinica Chimica Acta, 194:73-90 (1990)]で実施することができる。

しかしながら、これらの検出法には重大な欠点がある。比較的高濃度の増幅産物を収容する反応容器を開くと、通常は飛沫やエアゾ

ールが形成される。このような飛沫やエアゾールは潜在的汚染源となる恐れがあり、陰性核酸やまだ増幅されていない核酸が汚染され、誤まった結果を生じる恐れがある。

サンプル調製、反応試薬調製、増幅及び反応産物の分析に使用する作業場所及び装置にも汚染に関する同様の問題が生じ得る。接触伝達（運搬）やエアゾール生成によってこのような汚染が生じる場合もある。

更に、これらの公知検出法は時間消費的且つ労働集約的である。プローブハイブリダイゼーション法は典型的には伸長産物を変性させる段階と、プローブをアニールする段階と、場合によって反応混合物から過剰のプローブを分離する段階が必要である。迅速な結果が所望される場合にはゲル電気泳動も非実用的な検出法であるので不利である。

米国特許第5,229,297号及び対応EPO381501A2 (Koda

k) は、

汚染の危険を減らすために密閉環境内で核酸材料の増幅及び検出を実施するキューベットを開示している。該キューベットは一連の通路により相互に連結された区画をもつ密閉デバイスである。区画はDNA鎖を増幅するための反応区画と、増幅したDNAを検出するための検出部位をもつ検出区画に分けられる。試薬を収容する貯蔵区画も備え得る。核酸材料のサンプルは貯蔵区画からの試薬と共に通路を通過して反応区画に送られる。貯蔵区画の出口通路は増幅産物が貯蔵区画に逆流しないように逆止め弁を備える。サンプルを反応区画で増幅し、弾性区画壁に外圧を加えて増幅産物を反応区画から通路を介して検出区画内に吸引することにより、相互連結通路を通過して検出区画の検出部位まで増幅産物を移送する。あるいは、ピストン装置をキューベットに備え、試薬及び／又は増幅産物を反応区画から検出区画にポンプ輸送してもよい。

E P O 3 8 1 5 0 1 A 2 (K o d a k) に開示されているキューベットは密閉反応及び検出環境を提供するが、いくつかの重大な欠点がある。例えば、同出願の図1～18に示されるように、多重区画、多重通路、逆止め弁及びポンプ輸送機構は比較的複雑な構造であり、簡単には製造できない。また、E P O 3 8 1 5 0 1 A 2 に開示されているキューベットの形状と構造は慣用的熱サイクリングデバイスに容易に挿入できない。更に、キューベットにより使用される流体移送法は、弾性側壁に押し付けるローラー装置や小ピストンの排気など機械的外圧源が必要である。このような外圧源を備えるように慣用的熱サイクリングデバイスを改造するのは容易ではない。最後に、この文献に記載されている装置は、開示デバイスの処理量が非常に制限されている。システムは製造に所望される柔軟性を欠いている。

仏国特許公開第2672301号(L a r z u l) は類似のDNA増幅用気密試験デバイスを開示している。このデバイスも多重区画とサンプル及び／又は試薬の移送用通路を備える。流体輸送用動力源は液圧、磁気移動、受動的毛細管現

象、熱勾配、蠕動ポンプ及び機械的に誘導される差圧（例えば圧搾）であると記載されている。

均一増幅及び検出を実施する方法は制限的に記載されている。H i g u c h i ら, B i o / T e c h n o l o g y, 10: 413-417 (1992) は、密閉反応容器で増幅核酸の P C R 増幅及び検出を実施する方法を記載している。H i g u c h i らは、反応容器及び反応試薬に臭化エチジウムを加えて増幅と検出を同時に実施することを教示している。増幅反応で生成された増幅核酸をその後、d s - D N A と結合する臭化エチジウムによって生じた蛍光の増加により検出する。著者

らは、熱サイクリングの前、後又はその間に増幅反応容器の壁を通して励起させることにより蛍光を測定すると報告している。

米国特許第 5, 210, 015 号も P C R 増幅反応中に標的の検出を行う標的核酸の増幅及び検出方法を開示している。この文献は、標的にアニールすることが可能な標識オリゴヌクレオチドプローブと非標識オリゴヌクレオチドプライマー配列を反応混合物に加えることを教示している。増幅中に標識オリゴヌクレオチドフラグメントはポリメラーゼの 5' → 3' ヌクレアーゼ活性によって反応混合物中に放出される。こうして、ハイブリダイズしたデュプレクスから放出される標識フラグメントによってサンプル中の標的の存在を検出する。

1992 年 4 月 6 日付けで出願された本願と同一名義の同時係属出願第 07 / 863, 553 号、発明の名称「内部全反射による核

酸又は分析物の検出方法及びデバイス (Method and Device for Detection of Nucleic Acid or Analyte by Total Internal Reflectance)」も、増幅と検出を同一容器内で実施する反応容器を開示している。増幅産物は固定捕獲試薬との特異結合によって光学素子上で捕獲される。増幅産物と捕獲試薬が結合すると、光学素子内に生じるエバネッセント波の侵入深さの内側に蛍光標識が生成される。蛍光標識の結合の結果として蛍光が変化し、この変化を検出す

る。

これらの開示にも拘わらず、密閉反応容器も均一アッセイも未だ商業的に広く利用されていない。従って、従来技術の欠点を解消すると共に、容易に製造される構成で効率的で高信頼性の無菌試験環境を提供する増幅検出システムが必要とされている。

発明の要約

一般に、本発明は反応サンプル中の標的リガンドの検出方法に関する。本開示中で標的リガンドは核酸であるが、本発明は捕獲部位と特異的に結合して検出可能なシグナルを発生し得る多数の他の標的リガンドにも広く適用できることが理解されよう。例えば、本発明の概念は抗体と抗原などの免疫対のメンバーのアッセイにも適用することができる。

従って、本発明はアッセイ反応の結果の分析方法に関し、該方法は、各々同一分析物に対して特異的であり且つ各々シグナル領域以外に非シグナル領域を含む複数の複製物捕獲部位と、分析物の存在又は量を表す検出可能なシグナルを該複製物部位のシグナル領域で発生する手段とを含む固体担体を準備する段階と、標的分析物を含む疑いのある反応サンプルに前記担体を暴露し、分析物が存在する場合には検出可能なシグナルを前記複製物部

位で発生する段階と、前記複製物捕獲部位のビデオ画像を生成する段階と、前記複製物部位の各々について前記ビデオ画像のデジタル表現を生成し、前記デジタル表現をコンピュータメモリに記憶させる段階と、前記デジタル表現を分析し、前記検出可能なシグナルが分析物の存在又は量の尺度として存在するか否かを判定する段階を含む。

好適態様では画像の走査線を生成することによりビデオ画像のデジタル表現を実施し、各走査線は複数の画素を含む。即ち、各画素は該画素におけるビデオ画像のグレースケール等価値を表す数値（8ビットシステムの場合には0～255）を割り当てられる。その後、このデジタル表現をコンピュータで処理し、各走査線毎に平均、標準偏差及び範囲値などの統計値を計算することができる。

統計情報を使用してまず最初にシグナル領域をバックグラウンドから区別する。

バックグラウンドのみであると分類される走査線を使用してバックグラウンド勾配を決定する。この勾配は担体の両端間の照明と位置のばらつきを表す。この勾配を使用して基線即ちバックグラウンドシグナルに対してシグナル値を正規化する。好ましくは、輪郭強調法を用いてシグナル領域の外周を更に明確に画成する。

本発明の主要な特徴は、特定捕獲部位の内側で多重「複製物」部位又はゾーンを用いることである。このような「複製物部位」は各々シグナル領域の一部とバックグラウンド領域の一部を含む。各分析物捕獲領域に複数のこのような複製物部位が存在する。

各複製物のデジタル表現を計算することにより、領域（シグナル及びバックグラウンドの両者）を同一分析物の他の複製物部位の領域と比較することができる。複製物のいずれかが有意に異なる結果を示す場合には、こ

れらの部位からのデジタルデータを排除し、結果判定の信頼性レベルを改善することができる。

好適方法では、担体はビデオ画像の一部として読取られるバーコード又は他の光学コード化情報も含む。この情報は担体上に存在する複製物部位の数、位置及び種類に関してコンピュータに指示するために使用できると共に、異なる分析物捕獲領域の数、実施すべき試験の種類、更にはコード化患者識別に関する情報も提供する。

図面の簡単な説明

図1はブロック図により本発明のシステムの一般要素を示す。

図2A～2Hは組み立て前の反応／検出ユニットの1例の数種の図を示す。図2Aは図2Cのa-a線における部分横断面図であり、上部即ち検出チャンバーを示す。図2Bは検出ユニットに挿入するために整列した下部即

ち反応チャンバーを示す。図2Cは図2Aのc-c線における横断面図である。

図2 D及び2 Eは図2 Cの夫々d-d及びe-e線における横断面図である。図2 Dは正面向きを示し、図2 A及び2 Eは側面向きを示すことが理解されよう。図2 F、2 G及び2 Hは反応チャンバーを検出チャンバーに密封可能に係合し、サーマルサイクラーホルダーに挿入した後の反応／検出ユニットを示す。図2 Fは図2 Aと同様に側面横断面図であり、図2 Gは正面横断面図であり、キー締め手段の例を示す。図2 Hは図2 Fのh-h線における横断面図である。

図3 A～3 Dは本発明による反応／検出ユニットの数種の態様及び変形例を示す。図3 A及び3 Bは反応チャンバーを検出チャンバーに密封可能に係合後の反応／検出ユニットのスナップ嵌め態様を示す。図3 C及び3 Dは反応／検出ユニットの変形例の横断面図で

あり、係合手段と検出構成が図3 A及び3 Bと異なる。

図4 A～4 Dは組立後後反応／検出ユニットの密封可能な係合手段の拡大図を示す。図4 Aは標準摩擦即ちルアー嵌めの横断面図、図4 Bは爪即ちスナップ嵌めの横断面図、図4 Cは爪即ちスナップ嵌めの変形例の概略図、図4 Dはねじ型密封の横断面図を示す。

図5 A～5 Dは本発明の方法によるユニットの反応チャンバーから検出チャンバーへの増幅反応サンプルの移送を示す。検出チャンバーの各側面図の上に該チャンバーの正面図を示す。

図6は各段を環状リングとして構成した、本発明で用いる2段加熱エレメントの好適態様を示す。

図7は本発明の好適サーマルサイクラーデバイスの部分横断面図を示す。

図8 A～8 Dは本発明の好適検出システム

の択一的態様を示す。図8 Aは電動リングを備える態様を示し、図8 Bは電動ミラー及びランプを備える固定リングを示し、図8 Cは反射検出構成を示し、図8 Dは透過検出構成を示す。

図9 A～9 Kは本発明により2部分型サーマルサイクラーの加熱エレメントを制御する制御プログラムを示すフローチャートである。

図10は図1のシステムの種々の相の温度及び時間分布を示す。

図11A～11Dは本発明によりビデオ画像を処理するコンピュータプログラムを示すフローチャートである。

図12A及び12Bは夫々図2A及び3Aに示すストリップ担体の読取ゾーン部分68の拡大図である。

図13及び14は夫々実施例6及び12に記載するような6個の反応サンプルの結果のデジタル化写真画像である。各図中、左側

の3個のサンプルは標的DNAを含み、スポット又はバンドが見えるが、右側の3個は標的DNAを含んでいなかった。

本発明の態様の詳細な説明

詳細な開示の概要

1. システム概説
2. 反応／検出ユニット
 - a. 反応チャンバー
 - b. 検出チャンバー
 - c. 検出担体
 - d. 密封機構
3. 熱サイクリング及び移送デバイス
 - a. サイ클ラーデバイス
 - b. 移送方法
4. 検出システム
5. コンピュータ／回路制御
6. 熱制御
 - a. ハードウェア
 - b. ソフトウェア
7. ビデオ処理
8. 核酸増幅及び検出方法

9. 本発明のキット

10. 実施例

11. 配列表

1. システム概説

図1は本発明により構成した増幅検出装置の一般化概略図である。装置10は熱サイクリングデバイス16を含み、該デバイスは各々下記に詳述する第1及び第2の加熱エレメント段17及び18と夫々に付属する熱センサー122、123、ファンモーター19並びに検出システム22を含む。装置10は更に、熱サイクリングデバイス16に連結したコンピュータコントローラ26を含む。一般に、熱サイクリングデバイス16は、反応サンプル中に存在する標的核酸を増幅及び／又は移送するために、ヒーター段1（17）及

びヒーター段2（18）の各々に独立信号を送るコンピュータ26の制御下で、サーマルサイクラーデバイス16の内側に収容された反応容器の局在セグメントに所定温度を独立して供給することが可能である。デバイス16のコンピュータ制御の詳細については後節に記載する。

装置10は更に、複数の反応／検出ユニット20（図2～3参照）を含む。ユニット20は、図2A～2H及び3A～3Dに示すように、反応チャンバー30と検出チャンバー32を含む2部分型密封可能構造をもつ。反応チャンバー30は所望の増幅反応を実施するために反応サンプルを収容する。検出チャンバー32は増幅反応の結果の検出可能な指標を発生する手段を備える。これらの反応／検出ユニット20の特定態様及び変形例については本開示中で追って詳述する。

増幅反応方法は、反応サンプル38を所望

の増幅試薬と共に反応チャンバー30に挿入することにより開始する。次に検出チャンバー32を反応チャンバー30と結合して密封ユニット20を形成した後、このユニットを図2F及び5A～5Dに最良に示すように熱サイクリングデバイス16の加熱段17、18に配置する。反応チャンバー30と検出チャンバー32の結合後、ユニット20は密封状態に保たれ、増幅及び検出の両者を実施す

るための密閉環境を提供する。

コンピュータ26は実施する増幅反応の種類に依存して任意の温度サイクルの温度設定及びタイミングを制御する。PCR又はLCRなどの増幅反応では、コンピュータ26は加熱段が高／変性温度とこれに続く低／アニーリング温度のサイクルを1回以上実施するようにプログラムされる。2段式の場合には、コンピュータ26は上段加熱段17の温度を下段加熱段18から独立して制御することが

できるが、同一プロトコルに従ってもよい。

増幅反応が終了すると、密封反応／検出ユニットを開かずに、反応サンプルは密封ユニット20の反応チャンバー30から検出チャンバー32へと移送される。反応サンプルは好ましくは、反応チャンバー30内の推進剤を膨張させてサンプルと試薬を検出チャンバーに圧入することにより移送される。

検出チャンバー32は増幅反応の結果の検出可能な指標を発生する検出手段を含む。一般に、検出手段は反応サンプル38中に存在する増幅標的核酸を固定及び蓄積する1個以上の捕獲部位74をもつ担体60を含む。固定した増幅標的核酸は捕獲部位74の検出可能な指標と関連付けられ、この指標は検出システム22及びコンピュータ26により検出及び分析される。

以下、上記一般概説の複数の変形例を含めて装置10の種々の要素を各々詳細に説明す

る。

2. 反応／検出ユニット

a. 反応チャンバー

本発明の反応／検出ユニット20は図2A～2E、3A～3D及び他の図面に示す。各ユニット20は反応チャンバー30と検出チャンバー32を含む。ユニット20は使い捨て式であり得る。

核酸増幅反応は反応チャンバー30で実施される。反応チャンバー30は核酸の変性に必要な温度、典型的には80～110℃に耐えられるガラス又はプラス

チックなどの材料から作成される。細長形反応チャンバー30の下端34は閉じており、上端36は反応サンプル38と必要に応じて増幅反応試薬を受容できるように開いている。このような反応試薬は使用者が反応チャンバー30に加えてもよいが、好ましくは製造中に加え、除去可能又は破壊可能なシール（図示せず）によっ

て封入し、その場合には使用者は試験サンプルのみを加える。試験サンプルは任意の公知手段によって反応チャンバー30に挿入できる。例えば、注射器（図示せず）に入れ、シールを除去するか又は中空腔を備える注射器先端でシールを穿孔することによって反応チャンバーに挿入することができる。こうして、反応チャンバー30内の反応サンプルは試験サンプルと増幅試薬の両者を含む。反応サンプルに更に推進剤40と検出システムの1種以上の成分を加えてもよい。

チャンバー30の寸法は比較的少量の反応サンプル38をかるうじて収容できる程度に選択すべきである。好ましくは、チャンバー30は約10 μ L～約200 μ Lの反応サンプルを収容するような寸法である。より好ましくは、チャンバー30の容積は約50 μ L～約120 μ Lである。反応チャンバー30は更に、反応チャンバー30内の表面張力を

下げ、加熱中の反応サンプルが発泡しないように適切な寸法とすべきである。更に、反応チャンバー30は反応サンプルへの熱伝達率を高めるように高い表面積対容積比をもつべきである。好ましくは、反応チャンバー30は長手方向軸をもつ細長い管状である。1好適態様では、反応チャンバー30は下端を密封した微量注射器管又は毛細管である。

内壁が滑らかな反応チャンバーは、特に閉じた下端34において内部に凹凸表面をもつチャンバーよりも性能が劣ることが判明した。例えば、加熱は明らかに内面に凹凸を生じるが、開放微量注射器又は毛細管の一端をヒートシールすると良好に挙動し、閉端毛細管（例えばVarivest, Grass Valley, CAの製品：実施例4参照）は予め融解しない限り性能が不良であった。凹凸表面はサンプルの底部又はその近傍で蒸発を開始するための核形成部位を提供

すると仮

定される。但し、本願出願人は特定の理論や動作メカニズムに限定又は拘束する意図はない。

管の内部を機械的に研削又は粗面化したり内部に溝や稜を設けても性能が改善する。反応管の底に小型の沸騰チップもしくはスティック又は微粒子ビーズを加えても性能を改善できる。例えば、直径約1.0～0.1mmの寸法のポリスチレン、ガラス、セラミック、ステンレス鋼又は他の適切な不活性材料のビーズが核形成部位として有用である。粒子が反応チャンバーの内側に入りさえすれば、粒子サイズは特に限定されないと考えられる。このような粒子は反応試薬に対して不活性であるべきであり、反応サンプルよりも稠密であるべきである。

b. 検出チャンバー

増幅した標的核酸は図2及び3に示すように検出チャンバー32で反応サンプルから分

離される。検出チャンバー32はプラスチック又はガラスなどの透明材料から作成され、開放端48と閉鎖端54をもつ。反応サンプル38は開放端48を通して検出チャンバー32に流入し、(下記に詳述する)検出担体60に遭遇する。

好適態様(図2)では、検出チャンバーは反応チャンバーから供給されるサンプル流体を収容するレザーバ37を含む。これは、サンプル流体を開放端48に導き、流体が検出チャンバーの側面から流入するように検出チャンバー32の床面よりも高位にオリフィス39をもつ流路を通すことにより実現される。あるいは、立管入口によってレザーバを形成してもよい。レザーバ37は、反応チャンバー30内で流体サンプルが冷却されて減少しても、検出担体手段60に反応サンプル流体を供給し続ける(図5C及び5D比較。レザーバ内の流体は反応管に戻らずにストリップ

61により吸収される)。レザーバと側面入口オリフィス39をもつ細長形検出チャンバーでは、山形フィン43を成形して検出チャンバー全体に強度を付加す

るのも有用であり得る。

別の好適態様では、検出チャンバーの横断面形状（図2C）はただ1つの可能な向きにしか加熱段の対応する溝に嵌め込めないような多角形又は非対称である。これは台形受座を示す図2F及び2Hに最良に示される。透過検出構成（下記参照）では、チャンバーの前面と後面を実質的に平行に維持するのが好ましい。台形は固定向きでありながらこの配置を確保する最も簡単な多角形である。他方、他の多角形又は非対称形状も予想できる。反射検出構成（下記参照）では前面と後面が平行である必要はなく、他の多角形が適切である。円形受座構成を使用する場合には、単一向きを伝えるためにカム又は平坦側面を備え

得る。受座は光学面と同一構成である必要はない。

検出チャンバー32（及び／又は反応チャンバー30）は、熱サイクリングデバイス16の内側でチャンバーを支持し且つ取り扱いを簡単にするタブ部材58（図2G及び7参照）を含み得る。タブ部材58は更に、加熱段17に配置されたキー溝91（図2G及び7参照）と係合する手段を含み得る。検出システムが加熱段に対して固定されている限り、多角形に代わるこの構成でも加熱段及び検出システム22に対して検出チャンバー32を規定の向きに確保できる。

図3A～3Dは図2の好適態様に代わる態様を示す。これらの態様は類似の要素と特徴をもち、これらの要素には図2の態様と同一符号を付す。但し、図3の態様はレザーバを含まない。

ユニット20は更に、好ましくは検出チャ

ンバー32に配置されたバーコード（図示せず）を備え得る。バーコードを読取るために熱サイクリングデバイス16に設けられたバーコードリーダー（図示せず）がコード化情報をコンピュータ26に送信し得る。バーコードは特定ユニット20を識別することができ、サンプル及び実施しようとする反応に関する他の関連情報を提供することができる。この情報は、コンピュータ26により実施されるビデオ処理プログラムに関して本開示中で後述するように患者識別及び／又は捕獲部位74の構成を含み得る。

c. 検出担体

検出チャンバー32は更に、反応サンプルを受容し、増幅標的DNAを分離し、増幅反応の結果の可視指標を発生する検出担体手段60を含む。典型的には、検出担体手段は、不均一アッセイで周知のように、標的の存在を表すシグナルを蓄積することが可能な固体

担体を含む。

このような固体担体は、例えばプラスチック、ガラス、天然及び合成ポリマー並びにその誘導体を含み、例えばセルロースエステル、微孔質ナイロン、ポリニフ化ビニリデン、紙及び微孔質膜を含む。担体は例えば繊維、ビーズ、スライド、円筒ロッド又はストリップの形状であり得る。好適態様では、検出担体手段60は毛細管移動を実施可能な微孔質ストリップ61（図2、3及び5参照）である。より好ましくは、多孔質担体はニトロセルロースであり、例えば約 $2\mu\text{m}$ ～約 $20\mu\text{m}$ 、通常は5又は $10\mu\text{m}$ の気孔寸法をもつニトロセルロースである。好ましくは、多孔質担体は不活性であるか又は、ブロッキング剤及び／又は輸送助長剤（例えば米国特許第5,120,643号参照）を使用して不活性にし、一般には反応サンプル中の試薬又は標的核酸と物理的又は化学的に反応しない。

輸送助長剤の使用は当該技術分野で公知であり、実施例3に詳述する。多孔質及び微孔質担体は毛細管現象による吸上作用とクロマトグラフィー特性を示すが、本発明は非クロマトグラフィー担体及び非多孔質担体も包含する。

検出担体手段60は、円形即ちディスク形状又は矩形形状を含む任意の適切な形状であり得る。検出手段60の寸法は、検出手段60に固定された増幅標的核酸により発生される可視指標を十分に解像できるように選択すべきである。検出手段60は好ましくは、固定された標的核酸の検出に必要な時間を短縮し且つ材料使用を最小限にするように小さく及び／又は薄い。当業者は反応サンプル38の容量、増幅標的の量及び反応チャンバー30と検出チャンバー32の寸法を考慮して検出手段60の寸法を最適化することができよう。検出手段60を収容す

るように検出チャ

ンバー32を構成してもよい。

典型的には、例えば担体の気孔寸法及び厚さに応じて異なる速度で異なる担体材料60が反応サンプル38を受容及び輸送する。担体は追って詳述するように、増幅標的核酸と結合するために必要な時間を上回る速度で特異結合対メンバー又は捕獲分子を通り越して反応サンプル38を輸送しないように選択すべきである。

好適担体60は、反応サンプルの輸送が開始する第1の端部62と、反応サンプルの輸送が終了する第2の端部64と、増幅標的核酸を検出チャンバー32内で単離させるメカニズムを含む1個以上の領域66, 68, 70を含むストリップ61である。

図2D及び5Dに示すように、ストリップ61は少なくとも2領域を含み、ストリップ61の第1の端部62又はその近傍の第1の領域66は反応サンプル中に存在する増幅標

的核酸を標識するように機能し、第2の領域68は標識した増幅標的核酸をストリップ61に固定することにより反応サンプルから分離するように機能する。第2の領域68は1個以上のゾーンを含んでもよく、各ゾーンは標的核酸を固定し、標的核酸が捕獲部位に固定されると可視指標を提供する少なくとも1個の捕獲部位74を含む。捕獲部位74は図2D及び3Cに示すように連続バンドとして配置してもよいし、図2Gに示すように不連続バンドとして配置してもよいし、図3A及び5A～5Dに示すように独立スポットとして配置してもよい。捕獲領域内の多重捕獲部位及び複製物部位の意義については後述する。

標識機能はスポット自体で行う必要はなく、反応サンプルの内側を含めて反応サンプルと捕獲部位の間の任意の点で行い得ることが理解されよう。例えば、複合パッドを検出担体の下端に付着し得る。このようなパッドは反

応チャンバーの開放端36、検出チャンバーの開放端48、又は図2に示す態様

のオリフィス39もしくはレザーバ37に配置してもよい。複合パッドをストリップに付着しないとしても、少なくともストリップと接触させると好ましいと思われる。

ストリップ61は、検出システム22の対照ゾーン又は参照標準として機能する第3の領域70を含み得る。好ましくは、このような全領域66, 68, 70は担体61の空間的に別個の領域である。領域66, 68, 70の機能については、増幅標的核酸の検出方法に関連して追って詳述する。

担体61は必要に応じて不活性基板に固定してもよく、このような基板は好ましくは構造支持体を提供するに十分に強固なガラス、プラスチック又はナイロンなどの透明材料から作成される。図2及び5に示す態様では、検出チャンバーはストリップを強固に保持す

るピン又はフィンガー41を備える。このようなピン又はフィンガー41は製造中にチャンバーハウジングに成形できる。担体及び基板は好ましくは検出チャンバー32の内側に固定位置又は角度に配置されるので、担体61に固定された増幅標的核酸の検出は、本発明の方法に関連して後述するように、検出システム22に対して所定位置又は角度で実施することができる。

d. 密封機構

検出チャンバー32は、増幅反応が一旦実施されたら増幅核酸が漏れないように反応チャンバー30と密封結合するように設計される。このために、反応／検出ユニット20はチャンバー30, 32を相互に密封可能に係合する係合手段を含む。係合手段は数種の公知手段の任意のものによって達せられる。係合手段は、チャンバー30, 32から潜在的に汚染している流体が漏出しないように確実

な密封を形成すべきであり、換言するならば温度もしくは圧力上昇条件下又は通常操作及び／又は廃棄条件下で開いたり、分離すべきでない。

図4A～4Dはユニット20の2個のチャンバー30, 32を密封可能に係合又は結合する数種の機構を示す。恐らく、最も簡単な機構は標準ルアー即ち摩擦嵌めである。これは図4A、図2などに拡大して詳細に示す。反応チャンバー3

0の開放上端36はその外周面にベベル面44を含み、検出チャンバー32の開放端48はその内周面にベベル面50を含む。2面44、50のベベル角は、図2E、2F、3C、3D及び4Aに示すように2個のチャンバーを相互に圧着したときに緊密な摩擦嵌めが達せられるように組み合わせる。図示しないが、この密封機構の変形例はルアーロックシステムと差込み固定システムを含む。

図4Bは第2の密封機構を詳細に示す。これは標準ルアー嵌めのスナップ嵌め又は爪変形例である。上端36はその外周面にベベル面44と環状ショルダー又は爪46を含む。検出チャンバー32はベベル面50と環状爪又はショルダー52を含む。この場合もベベル角は緊密な密封を形成するように組合わせ、環状ショルダー46、52はこれらの2部分が分離しないように相互に締め付け合う。スナップ嵌めの別の変形例を図4Cに示す。形状は多少異なるが、要素はすべて同様であり、同一符号を付した。スナップ嵌めはショルダー52が面44を越えてショルダー46と係合するように両端を係合させることにより達せられる。

図4Dに示す最後の密封機構では、反応チャンバー30の開放端36は雄ねじ47を備える。検出チャンバー32の開放端48は内側に同様に対応する雌ねじ49を備える。反

応チャンバーを検出チャンバーにねじ込むことにより、密封反応／検出ユニットが得られる。本発明の範囲内で多数の他の等価密封変形例が可能である。理想的には、密封機構は通常操作条件下で実質的に不可逆的である。

本発明の反応／検出ユニット20は後述するように1又は2段熱サイクリングデバイスと併用できる。

3. 熱サイクリング及び移送デバイス

a. サイ클アーデバイス

図6及び7は、図1に略示した熱サイクリング及び移送デバイス16の好適態様の詳細を示す。もっとも、単段及び多段加熱／伝達ユニットのいずれも本発明のデバイス及び方法で使用するのに適していることを理解されたい。即ち、サイクラー16はコンピュータ26の制御下で所望の温度を反応チャンバー30に供

給するために少なくとも1個の加熱段17、場合によっては2個の加熱段17及

び18を含む。1好適態様では、加熱段は環状下段加熱リング92から空間的に分離された環状上段加熱リング90を構成する。加熱リング90、92間の空間は絶縁体として機能するが、他の絶縁材料も使用し得る。加熱段は直線、平面又は楔（図示せず）など種々の他の形状でもよい。冷却期間中にリング90、92の温度低下を助長するために、典型的には径方向に内側に向かって、離間した1個以上のフィン93がリング90、92上に配置される。冷却フィン93の下にはファン94が配置され、冷却期間中にリング90、92の温度低下を更に助長する。

加熱リング90、92はアルミニウム、銅又は金などの熱伝導材料から作成される。熱は図6に示すように好ましくはリング90、92の外周面に沿ってリングに付着された慣用抵抗熱ストリップ95、96を介して、又はマニホールドなどの他の公知手段により、

又は伝導によってリング90、92に供給され得る。多段システムでは、コンピュータ26は熱ストリップ95、96の各々に独立して電力を供給することにより各加熱リング90、92の温度を独立して制御することができる。コンピュータは2段を1段であるかのように連動させることもできる。

図7に示すように、ユニット20は、反応チャンバー30の第1の長手方向セグメント33が上段リング90にさらされ且つ反応チャンバー30の第2の長手方向セグメント35が下段リング92にさらされるように、加熱リング90、92の数個のアーチャー又はウェル97の内側に配置される。図6及び7に示すように、ウェル97は各々上段リング90のアーチャー98と下段リング92のアーチャー99の組合わせによって構成される。上段リングアーチャー98は上段リング90を貫通する。ウェル97に反応／検出ユニッ

ト20を支持する何らかの手段（例えば上記タブ部材58）が存在するならば、下段リングアーチャー99は、図2G及び7に示すように下段リング92を貫通

し得る。あるいは、下段リング92の一部のみにアパーチャ99を形成し、反応チャンバー30の密閉底34を下段リング92に支承させてもよい。

コンピュータ26（図1参照）は、反応チャンバー30内の反応サンプル38を所定の温度にするように上段加熱リング90、任意下段加熱リング92及びファン94を制御する。熱サイクリングデバイス16の加熱及び冷却サイクルとコンピュータ26によるその制御については、コンピュータ／回路制御に関する開示中で追って詳述する。増幅反応が完了すると、コンピュータ26は推進剤40にその閾値膨張温度以上の温度の熱を供給するように加熱エレメントに指令する。閾値温度に達すると、推進剤40は膨張して反応サ

ンプル38を上方の検出チャンバー32に圧入する。1態様では、下段リング92を上段リング90よりも過剰に加熱して推進剤を膨張させる。

b. 移送方法

図5A～5Dは単段装置で反応サンプル38を反応チャンバー30から検出チャンバー32へ移送する経緯を示す。ユニット20は加熱エレメント16のアパーチャ97の内側に配置されている。代替2段システムでは、反応チャンバー30の第1の長手方向セグメント33（図2B及び3A）が上段リング90にさらされ且つ反応チャンバー30の第2の長手方向セグメント35（図2A及び3A）が下段リング92にさらされるように反応チャンバー30をアパーチャに配置する。

図5Aでは増幅反応が完了し、加熱エレメント16は推進剤40の閾値温度まで上昇しつつある。2段システムでは、増幅反応の完

了後に反応サンプル38を蒸発しにくくするために、上段リング90を最初に閾値温度よりも低い温度に維持し得る。推進剤40が増幅反応中に膨張しないように推進剤閾値を最高増幅反応温度よりも高くすると好適である。

本発明で使用する「推進剤」とは、刺激、好ましくは非機械的刺激に応答して膨張する任意物質を意味する。例えば、推進剤40は気体（例えば空気）、液体又は固体化合物であり得る。液体及び固体推進剤の場合には、一般に蒸発して膨

張する。推進剤40を膨張させる刺激は例えば熱、光、又はその組み合わせであるが、本発明では熱が好ましい。反応サンプル38自体を推進剤40として用いてもよい。液圧又は膜壁変形などの機械的圧力では推進剤は膨張しない。

図5Bでは加熱エレメント16は推進剤40をその閾値温度まで加熱し、推進剤40は膨張して反応サンプル38を検出チャンバー

32に向かって上昇させている。この時点で2段システムでは上段加熱リング90を閾値温度にし、推進剤40が第1の長手方向セグメント33を通して上昇しながら膨張するのを助長し得る。図10に関して後述するように、コンピュータ26は、下段加熱リング92の後で上段加熱リング90を閾値温度まで過熱できるようにプログラム可能な時間遅れを備える。

加熱エレメント（又は上段及び下段リング90，92）は、図5B及び5Cに示すように、反応サンプル38が検出チャンバー32、好ましくは側面開口39を通してそのレザーバ37に完全に移送されるまで閾値温度を供給し続け、推進剤40を膨張させる。

図5Cでは検出ストリップ60の第1の領域66が湿潤し始めている。この領域（又はサンプル経路の先端部分、上記参照）は好ましくはこの領域を通る増幅標的核酸と結合す

る標識（例えばゾーン67）を含む。この結合を行う1方法は、核酸に結合したハプテンと抗ハプテン抗体に結合したコロイド粒子を用いる方法である。コロイド金又はセレンや、着色ラテックス粒子が適切な標識である。ハプテン及びハプテン化は当該技術分野において公知であり、特に核酸のLCR及びPCR増幅との関連ではビハプテン化法が知られている。例えば、EP-A357011及びEP-A-439182参照。ハプテン化核酸がゾーン67を通るにつれて標識複合体は反応溶液によって可溶化されて移動し、核酸上のハプテンと結合する。あるいは、ハイブリダイゼーションや、伸長及び連結などの必要な酵素活性を妨げないという条件で検出可能な標識をプローブ／プライマーと直接結合してもよい。

溶液はストリップ61を上昇するにつれ、領域68で捕獲部位74に遭遇し、
場合によ

っては領域70で対照部位に遭遇する。捕獲部位74には第2のハプテンに対する第2の抗体が移動しないように固定されている。このハプテンに結合した全核酸はこれらの部位で固定される。固定核酸が増幅され、第1のハプテンも含むならば、複合体が捕獲部位に蓄積し、検出可能になる(図5D)。本発明の方法によって多重増幅及び検出できるように、各捕獲部位74に異なるハプテンに対する固定抗体を配置してもよい。あるいは、部位の各々の間で信号を平均できるように、同一ハプテンに対する抗体を多重捕獲部位74に配置してもよい。

本発明の熱膨張態様による移送は核酸アッセイ又はサーマルサイクラーに制限されないことも理解されたい。移送態様は、反応サンプルを反応位置から検出位置まで移動させることが所望される任意の場合に有用である。(例えば汚染の理由で) 密封又は密閉容器の

内側で移送することが望ましいような状況で特に有用である。他方、試薬が移送を行うのに必要な熱レベルに耐え得るという条件でイムノアッセイなどの非増幅非核酸アッセイにも使用できる。

4. 検出システム

増幅反応の結果は検出システム22及びコンピュータコントローラ26によって検出及び分析される。検出可能な標識は好ましくは可視標識であるが、UV、IR又は蛍光標識などの他の検出可能な標識でもよい。好適検出システム22は担体60のビデオ画像を生成し、ビデオカメラ100と担体60を照明する光源104(どちらも図7及び8A~8Dに示す)を含む。担体60の画像は直接又は反射によってカメラ100に送られ、カメラ100はコンピュータ26に送られるビデオ画像を生成する。分かりやすくするために、可視標識については追って詳述する。

検出システム22には種々の構成が適しており、そのいくつかの例を図8A~

8 Dに示す。一般に、検出システム22は検出手段60を照明する光源104と、検出手段60のビデオ画像を生成するカメラ100を含むべきである。カメラレンズを検出手段60に直接照準してもよいし、検出手段60の画像をカメラレンズに反射するようにミラーを配置してもよい。

図8 Bに示すように、検出システム22はカメラ100、カメラレンズ102、光源104、ミラー106及びミラー106に連結したモーター108（好ましくはステッパモーター）を含む。光源104は、カメラレンズ102が担体61から反射された比色信号を測定するように配置される。カメラ100とミラー106は加熱リング90、92と同軸に配置され、ミラー106は多孔質担体61の画像をカメラレンズ102に反射する

ような角度で配置される。カメラ100は固定しており、ミラー106はコンピュータ制御下にモーター108によって回転され、各検出チャンバー32のストリップ61の画像をカメラレンズ102に順次送る。カメラ100は各検出チャンバー32のストリップ61のビデオ画像を生成し、この画像をコンピュータ26に送って分析する。この画像を分析するためのソフトウェアについてはビデオ処理の項で後述する。

図8 Aは検出システム22の別の構成を示す。この検出システムはカメラ100、カメラレンズ102、光源104、ミラー106、及び加熱リング90、92に連結したモーター109を含む。光源104は、カメラレンズ102が担体61から反射された比色信号を測定するように配置されている。カメラ100とミラー106は加熱リング90、92と同軸に配置され、ミラー106は担体61

の画像をカメラレンズ102に反射するように選択された角度で配置されている。カメラ100とミラー106は固定され、加熱リング90、92はコンピュータ制御下でモーター109によって回転され、各検出チャンバー32のストリップ61の画像をミラー106に送るように各検出手段を順次移動させ、ミラーは画像をカメラレンズ102に反射する。カメラ100は各検出チャンバー32の

担体61のビデオ画像を生成し、この画像をコンピュータ26に送って分析する。

別の態様では、カメラレンズ100を担体61に直接照準し、ミラー106の必要を省いてもよい。別の態様では、光源をリングの内側に配置し、カメラをリングの外側に配置してもよいし、その逆に配置してもよい。これらの態様は図8Dに関して後述する透過検出を利用する。

図8Cの反射蛍光検出システムはカメラ1

00、カメラレンズ102、光源104、励起フィルター110及び発光フィルター112を備える。光源104とカメラ100は、カメラレンズ102が検出チャンバー32で担体61から発生される蛍光シグナルを受け取るように配置される。励起フィルター110は光源104と担体61の間に配置され、発光フィルター112は担体61とカメラレンズ102の間に配置される。

図8Dの別の蛍光検出システムはカメラ100、カメラレンズ102、光源104、励起フィルター110及び発光フィルター112を備える。光源104とカメラ100は担体61が光源104とカメラ100に挟まれるように配置される。こうしてカメラレンズ102は担体61を透過した蛍光シグナルを受け取る。励起フィルター110は光源104と担体61の間に配置され、発光フィルター112は担体61とカメラレンズ102の

間に配置される。透過検出システムは、1993年9月27日に出願された本願と同一名義の同時係属米国特許出願第08/127,387号、発明の名称「透過光測定による分析物の定量 (Quantitative Determination of Analytes Using Transmission Photometry)」(代理人整理番号5435, US, 01)に詳述されている。透過検出に適した回路は一般に知られているが、特定回路は同じく1993年9月27日に出願された本願と同一名義の同時係属米国特許出願第08/127,470号、発明の名称「光強度検出及び測定回路 (Light Intensity Detection and Measuring Circu

i t)」（代理人整理番号5367. U S. 01）に記載されている。これら2件の出願の開示内容全体は参考資料として本明

細書の一部とする。

検出システムは図8 C及び8 Dに示す透過又は反射法のどちらを使用してもよく、どちらの方法も検出手段60の画像を連続的にカメラに供給できると考えられる。特に、検出システムは図8 Bに示す回転ミラー及びモーターを組み込んでよいし、（ミラーの有無を問わず）図8 Aに示す回転加熱リング90, 92及びモーターを組み込んでよい。

5. コンピュータ／回路制御

図1に示すように、コンピュータコントローラ26はモニター113、キーボード114及びデータ記憶手段をもつIBM AT互換パーソナルコンピュータとして実装し得る。コンピュータ26は画像フレームグラバカード116、16ビットアナログ／デジタルI/Oカード118及びカスタムプリント基板（PCB）120を含む。適切なフレームグラバカード116は、Coreco

（カナダ、モントリオール）から市販されているCoreco（登録商標）OC-300である。適切なアナログ／デジタルI/Oカード118は、Data Translation Companyの市販品である。

図1のダイヤグラムはフレームグラバカード116、I/Oカード118及びPCB120に含まれる回路の簡易図である。フレームグラバカード116はカメラ100からビデオ信号を受け取って処理及び分析する。I/Oカード118とPCB120は、共同して加熱ストリップ95, 96及びファン19を制御することにより加熱及び冷却サイクルを制御する。PCB120は加熱ストリップ95, 96とファン19に適当な電力を送ると共に、加熱ストリップ95, 96の実温度をモニターするために使用される慣用回路を含む。1対のサーミスタ122, 123が加熱リング90, 92に連結され、リング9

0, 92の温度を感知する。サーミスタ122, 123はリング90, 92の温

度を表す出力信号を発生し、この信号はPCB120に戻される。

コンピュータ26は加熱ストリップ95、96とファン19を制御することにより加熱リング90、92の温度を制御するソフトウェアプログラムを含む。コンピュータ26は更に、フレームグラバカード116でビデオ信号入力を獲得及び分析するためのソフトウェアプログラムも含む。図9A～9Kは適切な熱制御プログラム200のフローチャートを示す。図11A～11Dは適切なビデオ処理プログラム600のフローチャートを示す。熱制御プログラム200及びビデオ処理プログラム600は、BASIC又はCなどの市販プログラミング言語を用いて実現し得る。

6. 熱制御

a. ハードウェア

一般に、熱制御プログラム200はI/Oカード118を介してPCB120に指示を提供する。例えば、デジタル信号で通信する熱制御プログラム200は上段及び下段加熱リング90、92に所望の「設定」温度を設定する。I/Oカード118はD/A変換器126、128でデジタルコンピュータ信号をアナログ信号に変換する。各加熱ストリップ毎に1個のD/A変換器を設け、従って2個の加熱ブロックを使用する場合には、各々の温度を別々に制御することができる。D/A変換器126からのアナログ出力は比較器130及びソリッドステートリレー132を介して上段加熱段17に送られ、D/A変換器128からのアナログ出力は比較器134及びソリッドステートリレー136を介して下段加熱段18に送られる。

一方のリレー132からの出力は上段加熱

リング90と連結した上段加熱ストリップ95に送られる。別のリレー136からの出力は下段加熱リング92と連結した下段加熱ストリップ96に送られる。リレー132、136は加熱ストリップ95、96を駆動させ、該ストリップは加熱リング90、92に熱を供給する。サーミスタ122、123は加熱リング90、92に連結され、加熱リング90、92の温度を感知して感知温度に対応

する電気信号を発生する。サーミスタ122からの信号は演算増幅器138を介して比較器130に送られ、他方のサーミスタ123からの信号は演算増幅器140を介して比較器134に送られる。更に演算増幅器138, 140からの出力はI/Oカード118上のA/D変換器142, 144に送られ、上段加熱リング90及び下段加熱リング92の現在の温度を表すデジタル信号をコンピュータ26及び熱制御ソフトウェアに提供する。

コンピュータ26は各段毎に所望又は「設定」温度を表すデジタル信号を発生する。これらの信号はD/A変換器126, 128でPCB120によって受け取られ、アナログ信号に変換され、設定温度に達するように加熱ストリップ95, 96を制御する。比較器130, 134はその2本の入力ライン上の電圧を連続的に比較する。比較器130の入力電圧は、(サーミスタ122からの)上段加熱リング90の温度とD/A変換器126から受け取られた設定温度に対応する。比較器134の入力電圧は、(サーミスタ123からの)下段リング92の温度とD/A変換器128から受信される設定温度に対応する。加熱リング90, 92のいずれかの感知温度がその設定温度よりも低い場合には、対応する比較器130又は134はリレー132, 136を介して加熱ストリップ95, 96に設定温度を出力し続ける。加熱リング9

0, 92の感知温度が設定温度を越えると、比較器130, 134は加熱ストリップ95, 96への出力を遮断する。こうしてプログラムはソリッドステートリレー137を介してPCBに指令し、ファンモーター19をオンにし、逆に冷却期間が完了し、即ち低設定温度に達した場合にはファンモーターをオフにできる。

b. ソフトウェア

図9A～9Kに示すフローチャートは慣用ブロック記号を用いて、熱制御プログラムにより実施される主機能を表す。熱制御プログラム200は4つの主セクション又はルーチンをもつ。第1のセクションは図9Aに示す「初期化」セクション202であり、ソフトウェア変数及び固定ハードウェアパラメータを従来通

りに定義することにより、コンピュータハードウェアがデータを受信できる状態にする。初期化セクション202はコンピュ

ータ26を起動すると実行される。第2のセクションは図9B～9Dに示す「編集」セクション204であり、このセクションにより、オペレータは必要に応じて特定変性プロトコル及び必要に応じてサイクル／過熱プロトコルを定義する種々のパラメータ選択を設定及び／又は変更することができる。第3のセクションは図9E～9Gに示す「変性」セクション206であり、加熱リング90, 92が変性プロトコルに選択された温度となるようにPCB120に指示する。第4のセクションは図9H～9Kに示す「サイクル／過熱」セクション208であり、加熱リング90, 92がサイクリングプロトコル及び過熱、又は閾値プロトコルに選択された温度となるようにPCB120に指示する。本明細書中で上述したように、過熱プロトコルは反応チャンバ30内の推進剤40を膨張させて反応サンプル38を反応チャンバ30から検出チ

ャンバ32に移送する。プログラム200は好ましくは所定サイクル数Xにわたって高温と低温のサイクルを繰り返した後、過熱サイクルに移る。

図9Aに示すように、初期化セクション202はブロック210でプログラム200を開始した後、ブロック212でソフトウェア定数及び変数を初期化する。ブロック212はコンピュータハードウェア上の記憶場所を割り当て及び定義し、プログラム変数を規定するなどの慣用ステップを実施する。これらのステップはコンピュータプログラムがコンピュータハードウェアと有効に通信できるようにするために必要である。ブロック214, 216及び218でプログラム200はオペレータに（コンピュータメモリ又はデータ記憶装置に記憶された）所望のプロトコルファイルを指定させるか又は1組のデフォルトプロトコル値を受理させる。プロトコルファイ

ルは、特定サイクリング／過熱プロトコルの特徴を定義する1組のパラメータの値を含む。いずれにせよ、プロトコルパラメータは後記編集セクション204で

オペレータによって変更できる。熱制御プログラム200の開示態様では、下記パラメータがプロトコルファイルに含まれ、最右列に示す値を例示値とする。開示プログラム200では、（オペレーションの終了時のみにファンをオフにするために使用される）遮断温度は編集可能なパラメータではなく、プリセットされている。

<u>パラメータ名</u>	<u>意味</u>	<u>例示値</u>
TEMP.DEN=	変性温度	95℃
TIME.DEN=	変性時間	120秒
TEMPLO=	低サイクル温度	60℃
TIMELO=	低サイクル時間	60秒
TEMPHI=	高サイクル温度	80℃
TIMEHI=	高サイクル時間	60秒
TIMELEAD=	過熱先導時間	15秒
TIMESUPER=	総過熱時間	30秒
TEMPSUPER2=	上段ブロック過熱温度	95℃
TEMPSUPER=	下段ブロック過熱温度	110℃
CYCLEMAX=	合計サイクル数	8
TRACK=	連動（オン/オフ）	オフ
SHUTOFF=	反応終了時の遮断温度	50℃
TIMEIMAGE=	画像遅延時間	120秒

変性プロトコル、サイクリングプロトコル及び過熱プロトコルを通して加熱リング（従って、反応チャンバー30）の温度対時間のプロットを示した図10に基づき、パラメータを説明する。図10は加熱段が2段存在するが、過熱サイク

ルまでは同一挙動をとるか又は一方のみを使用すると仮定している。図示するように、加熱リングは時刻 T_0 で特定温度で始動する。この温度は最後の増幅反応の終了時から維持された温度以下の任意の値である。図示例では、加熱リングは T_0 でほぼ室温である。 T_0 後に熱制御プログラム200は、加熱リングを第1の「設定」温度にするようにPCB120に指示し、該温度はこの場合には「変性温度」であり、サンプル及び／又

は任意のプローブ又はプライマー試薬中の核酸を変性させるために選択された値である。変性温度は典型的には約80～100℃であり、例示値は95℃である。すぐに設定温度に達することはできないので、温度は時間 $T_0 \rightarrow T_1$ の間に設定温度まで漸増即ち上昇する（傾く）。フィードバックサーミスタを介してプログラム200は加熱リングが選択された設定温度に到達した時刻を感知し、この温度を $T_1 \rightarrow T_2$ の所定時間（「変性時間」）維持し、サンプルDNA及び存在する場合には試薬プローブ又はプライマーを変性させる。

変性時間（ T_2 ）が終了するとプログラムは設定温度を「低サイクリング温度」に再設定し、加熱リングは時間 $T_2 \rightarrow T_3$ の間にこの新しい設定温度まで下降し、新しい設定温度は「低サイクリング時間」の間維持される。好ましくは、加熱リングの冷却を助長するようにファン19をオンにして下降勾配時間（例

えば $T_2 \rightarrow T_3$ 及び $T_6 \rightarrow T_7$ ）を最小にする。これらのパラメータの値は、被疑標的又は標的から形成されたアンプリコンにプライマー又はプローブを再アニールする温度及び時間を提供するように選択される。アニール温度は当業者に公知のようにプローブ長とグアノシン及びサイトシン残基の含量に依存し、典型的にはプローブ又はプライマーの予測 T_m よりも数度低い値に設定される。典型的なプローブ及びプライマー長では低サイクリング温度は約45～70℃であり得、例示値は60℃に設定する。この時間を図10では $T_3 \rightarrow T_4$ 示す。

次に、プログラムは設定温度を再設定し、図10で $T_4 \rightarrow T_5$ 及び $T_5 \rightarrow T_6$ に示すように「高サイクリング温度」まで上昇し、この温度を「高サイクリング時間」にわたって維持する。高サイクリング温度及び高サイクリング時間の値は標的

又はアンプリコンからのプ

ローブ又はプライマーを再び変性させるように選択される。一般に、高サイクリング温度はサンプル変性温度よりも僅かに低いが、アンプリコンの T_m よりも高くなければならない。約70～95℃の値が一般的であり、例示値は80℃である。

高サイクル時間が経過後、プログラムは設定温度を「低サイクリング温度」に再設定し、加熱リングは T_7 まで下降し、プロセスが繰り返される。各サイクルは図10に示すように高温と低温から構成される。「合計サイクル数」はサイクル数を制御する値をもつパラメータである。サイクル数は実施するアッセイによって大幅に変動する。PCR及びLCRでは10～70サイクル、一般に25～50サイクルが妥当である。

合計サイクル数に達した後、プログラムは過熱相に移り、図5A～5Eに関して上述したように反応サンプル38を反応チャンバー

30から検出チャンバー32へ移送する。2段システムでは、これは一般に上述の理由で下段をまず最初に過熱し、次に上段を過熱することにより行われる。場合によっては、図10に示すように上段よりも高い温度まで下段を過熱する。下段ブロック過熱温度及び上段ブロック過熱温度はこれらの過熱段階の間、その値を維持するパラメータである。上述のように、これらの値は推進剤を膨張させ、反応サンプルを検出チャンバーに圧入するように選択される。この温度は一般には変性温度以上であるが、反応チャンバー内の低部（即ち下段の内側）に推進剤を配置し、2段を連動しないようにすれば推進剤を変性温度から保護できるので変性温度以上にする必要がない。分かりやすくするために、水性反応サンプルを推進剤として使用し、過熱温度は一般に約90～120℃である。

2段システムで「過熱先導時間」は上段加

熱リング90をその過熱温度にする前に下段加熱リング92をその過熱温度にする選択時間である。過熱先導時間は図10では $T_8 \rightarrow T_9$ に示す。上記例示値は1

5秒である。先導時間の値及び過熱上昇の勾配の傾きに依存して時間 ($T_s \rightarrow T_u$) は勾配時間 ($T_s \rightarrow T_p$) より長くても等しくても短くてもよく、換言するならば T_u と T_p の相対位置は図と逆でもよい。「総過熱時間」は、上段（単段を使用する場合には単段）がその設定温度（例えば上段ブロック過熱温度）に到達する時刻から開始する過熱段階の時間値に相当する。この時間は図10では $T_e \rightarrow T_r$ に示し、十分な容量の反応サンプルを検出チャンバーに移送するために十分な長さであればよい。これは当然サンプル容量及び検出手段に依存するが、簡単な実験によって容易に決定可能である。例示値は30秒である。但し、全例示時間及び時間範囲は本明細書中で使用する特定態様

に適用されるものであり、当業者は他の範囲も容易に使用できることに留意されたい。

「連動」パラメータは、2段加熱エレメントの場合に上段及び下段加熱リング90, 92の両者が変性プロトコルとサイクリングプロトコルに関与するか否かを判定する。連動パラメータがオンの場合には、両方の加熱リング90, 92が変性プロトコルとサイクリングプロトコルに関与している。連動パラメータがオフの場合には、加熱リング90, 92の一方のみが変性プロトコルとサイクリングプロトコルに関与している。

「反応終了時の遮断温度」はプログラム200が試験プロトコルの終了時に加熱リング90, 92を冷却するファンモーターをオフにする設定温度であり、図10では T_h により示す。

「画像遅延時間」は単に検出手順を開始する前に指定時間待機するようにコンピュータ

に指示する。この時間は検出チャンバー内で信号を完全に発生できるようにするために十分な長さとするべきであり、使用する信号及び検出手段の種類に依存して約1～10分間以上であり得る。

第1の低サイクル温度の前に高サイクル温度を使用する増幅プロトコルを選択してもよいことが理解されよう。この場合には、低温まで下降し続ける前に選択

されたプロトコルによって決定される時間にわたって高サイクリング温度のプラトーを含むように時間 $T_2 \rightarrow T_3$ を単に拡張する。

図10は更に、変性及びサイクル／過熱ルーチンのプログラム状態を示す。これらの状態をソフトウェアに関連して以下に説明する。

再び図9Aに戻ると、プロトコルファイルを選択した（ブロック214，216及び218）後にプログラム200はブロック220及び222でモニター113スクリーン上

にヘルプテキストと現状プロトコルパラメータを表示する。ブロック220はヘルプ情報を提供し、オペレータがプログラム200を続行するためにどのステップをとるべきかを決定するのを助ける。ブロック222のスクリーン見出しは更に、所望の結果を得るためのキーストローク入力に関するプロンプトを提供する。

プログラム200はブロック224でサーミスタルックアップテーブルを初期化する。サーミスタ122，123の抵抗は温度と共に変化するが、これらの温度変化は非直線的である。従って、サーミスタ122，123のいずれかから読取値が発生される毎にプログラム200が温度を再計算する必要がないようにルックアップテーブルを提供する。I/Oカード118はブロック226で初期化される。これは、プリアンプ段階での利得設定や単極（0V～10V）又は双極（-5V

～+5V）信号レンジの使用などのようにI/Oカード118で使用される種々の値を設定する。ブロック228でプロトコルパラメータは初期化され、I/Oカード118は温度をデジタルに変換するように準備される。ブロック230でプログラム200は編集セクション204に移る。

プログラム200の編集セクション204を図9B、9C及び9Dに示す。一般に、編集セクション204によってオペレータは初期化セクション202のブロック216及び218で選択したプロトコルパラメータの一部又は全部を変更できる。編集セクション204はブロック236でキーボード204をクリアし

、これはキー=0を設定することに等しく、ブロック238で現在のプロトコルパラメータを表示する。プログラム200は加熱リング90, 92の現在の温度の連続表示を提供する。これは、上段及び下段加熱リ

ング90, 92からのアナログ入力を読取り、これらの入力をサーミスタルックアップテーブルで温度値に変換し、モニター113に温度を表示することによりブロック240及び242で行われる。ブロック244でプログラム200は更に、プロトコルパラメータを編集するためのプロンプトをオペレータに提供するパラメータ編集コマンド指示をモニター113上に表示する。

次に編集セクション204はブロック246でキーボード入力を受取るまで待つ。ここでオペレータはブロック250, 256, 260, 264, 270, 280, 284, 288, 294及び298に示すキーのいずれかを押すことによりプロトコルパラメータを編集することができる。ブロック250に示す「U」キーを押すとプログラム250はブロック251に進み、オペレータは高サイクリング温度と高サイクリング温度の時間を再

設定することができる。また、ブロック256に示す「L」キーを押すとプログラム200はブロック258に進み、オペレータは低サイクリング温度と低サイクリング温度の時間を再設定することができる。ブロック260に示す「C」キーを押すとプログラム200はブロック262に進み、オペレータは最大サイクル数を設定することができる。ブロック264に示す「W」キーを押すとプログラム200はブロック266及び268に進み、オペレータはコンピュータメモリ内のファイルに編集済みパラメータプロトコルを保存することができる。ブロック270に示す「F」キーを押すとプログラム200はブロック272に進み、オペレータはファン94をオンにし、所望により加熱リング90, 92の温度を低下させることができる。ブロック280に示す「D」キーを押すとプログラム200はブロック282に進み、オペレー

タは変性プロトコルの変性温度と時間を編集することができる。ブロック284

に示す「H」キーを押すとプログラム200はブロック286に進み、オペレータは過熱パラメータを編集することができる。過熱パラメータは下段加熱リングの過熱温度、上段加熱リングの過熱ラグタイム、上段加熱リングの過熱温度及び総過熱時間を含む。ブロック288に示す「T」キーを押すとプログラム200はブロック290に進み、オペレータは連動パラメータを編集することができる。プログラム200がブロック288でTキーをポーリング後、ブロック292で変性セクション206を開始することを見越してタイマーがセットされる。ブロック294に示す「E」キーを押すとプログラム200はブロック296に進み、プログラム200を出る。ブロック298に示す「S」キーは「状態」、「サイクル数」、「R時間」及び「キー」を

全て0に設定し（ブロック300）、プログラム200をブロック304から変性セクション206に移す。Sキーを押さない場合には、プログラム200は編集セクション204の始点に戻る。

変性セクション206（図9E、9F及び9G）はブロック310で開始し、ブロック312で現在のプロトコルパラメータを表示する。ブロック314はキーボード入力をクリアし、ブロック316は変性温度（TEMP. DEN）に入力された値を試験する。変性温度が0に設定されているならば、プログラム200は変性プロトコルをスキップし、「サイクル数」フラグを1、状態フラグを0に設定（ブロック318）した後、ブロック320を介してサイクル／過熱ルーチンに移る。ブロック420を介してサイクル／過熱セクション208に入ると、プログラムはブロック422でSETTEMP=TEMPHIに設定し、状態フラグを0にしてサイクル／過熱ルーチン208に入ることにより高サイクリング温度の抽出を開始する。

しかし、上記例示値を使用すると、変性温度は0よりも高い値（95℃）に設定される

ので、連動情報の獲得、変性温度の設定、ファン94をオフにするための数種の

サブルーチンを含むブロック322でプログラム200は変性温度と変性時間を初期化する。温度又は時間の「設定」は、温度にSETTEMP、SETTEMP0又はSETTEMP1、時間にRTIMEなどの変数を生成し、上記パラメータの1つから選択される値を変数に割り当てることであり、即ち温度変数にはTEMP.DEN、TEMPLO、TEMPHI、TEMPSUPER及びTEMPSUPER2を割り当て、時間変数にはTIME.DEN、TIMELO、TIMEHI、TIMELEAD及びTIMESUPERを割り当てる。従って、ブロック322でSETTEMP変数は変性温度のプロトコルに記憶された値をとる。

ブロック311、324及び326は、変性セクション206がオペレータからのパラ

メータ編集入力のためのキーボード114を引き続きをポーリングすることを示す。キーボード入力を受取られると、プログラム200は編集セクション204に移り、オペレータは現在のプロトコルパラメータの任意のものを編集することができる。プログラム200はブロック328及び330で温度表示を更新する。

ブロック332でプログラム200は分岐しねプログラム状態フラグ、キーフラグ及びR時間の値に依存して温度又は時間のいずれかをポーリングする。R時間（及び他の変数）はブロック300で0に設定したので、プログラムはこの最初のループ循環では温度をポーリングし、ブロック336に移る。ここでプログラム200はTRACK変数を試験し、2段システムの両方のブロックを平行にサイクリングすべきか否かを判定する。TRACK=オンの場合にはブロック338はプ

ログラムをブロック356に送り、両方のブロックを試験する。TRACK=オフの場合には、ブロック340はプログラムに一方のブロック（この例では上段ブロック）のみを試験させる。以下の説明では、TRACK=オフであると仮定するが、当業者はフローチャートのセクションによっては鏡面様性質の場合もあ

ることを容易に理解しよう。当然のことながら、単一加熱エレメントシステムでは、TRACK変数は不要であり、ただ1個のブロックのみを試験する。以下の説明は、上段ブロックのみを変性及びサイクリングに使用する2ブロックシステムに関するが、このようなシステムは単なる1態様であることが理解されよう。

変性セクション206では、プログラム状態フラグは0～3の4つの値をとることができる。一般に、プログラム状態フラグが0のとき（ブロック344参照）にはプログラム

200は加熱リングを変性温度にするようにPCB120に指示しており、プログラム200は（ブロック332で）I/Oカード118上のA/D変換器142, 144をポーリングし、上段加熱リングが変性温度に到達した時刻を判定する（ブロック346参照）。上段加熱リングが変性温度にまだ達していない場合には、プログラム200はブロック350, 372及び382を通り、ブロック311で始点の近くの主変性ループに戻る。ここからプログラムはブロック346に戻り、上段加熱リングが変性温度（95℃）に達したか否かを再び問合せ

る。プログラム200は上段加熱リング90が変性温度に達するまでこのループを続行する。今はブロック346の答えがイエスであり、プログラム200はブロック348でキーフラグを1に設定する。加熱リング90, 92が変性温度に達すると、キーフラグはブ

ック348で1に設定され、プログラム状態フラグはブロック374で1に増分される。更に、変数R時間はブロック378でパラメータTIME.DEN（変性時間）の値をとるように設定され、ブロック380でタイマーが始動され、プログラムは主変性ループに戻る（ブロック382及び311）。

R時間はここでは所定の値（例示値は120秒）をとるので、プログラムはブロック332でブロック396の「時間チェック」サブルーチンに分岐し、R時間が時間切れしたか否かを問合せ。特定機能に設定された時間（この場合は120秒、変性時間）が経過すると、R時間は「時間切れ（タイムアウト）する」

。この問合せに対する答えがノーであるならば、プログラムは変性セクション206の始点を通して帰還し、ブロック332及び334を介してブロック398の時間切れ問合せに戻る。時間切れ問合せに対する答

えがイエスであるならば、プログラム200はブロック400でプログラム状態フラグを（ここでは2に）増分し、ブロック402でキー及びR時間をリセットする。次にプログラム200はSETTEMP変数をパラメータ値TEMPLOに等しくなるように再設定し（ブロック406）、ファンをオンにし（ブロック408）、加熱ブロック90を低サイクリング温度まで下降させる。

プログラム状態フラグを2、R時間を0にリセットして主変性ループに戻ると（ブロック311）、プログラム200は分岐し、ブロック336、340、342及び344を通してブロック350に至り、ブロック352で上段加熱ブロック90を再びポーリングし、SETTEMP（ここでは低サイクリング温度）に達したか否かを判定する。上段加熱ブロック90がその設定温度（例示値は60℃）にまだ達していない場合には、プログ

ラム200はブロック372、382、311、332、336、340、342、344及び350を通してブロック352に帰還する。低サイクリングSETTEMPに達すると、プログラムはキーを1、状態フラグを3に増分し（ブロック348及び374）、ファンをオフにする（ブロック390）。次に、プログラムはキーを1、状態フラグを2に再設定してからサイクル／過熱セクション208の主ループに入る（ブロック392及び394）。変性ルーチン後にサイクル／過熱ルーチン208に入る場合にはサイクル／過熱ルーチンは低サイクリング温度で開始し、変性をスキップした場合にはプログラムは高サイクリング温度でサイクル／過熱ルーチンに入ることを理解されたい（上記ブロック318、320、420及び422参照）。

本例では、サイクル／過熱セクション208（図9H～9K）はブロック421で開始

し、SETTEMPは既に初期化されている。変性セクション206の場合と同様に、サイクル／過熱セクション208もパラメータ編集入力のためのキーボード114を引き続きポーリングし、適当な入力をキーボード114から受け取るとプログラム200を編集セクション204に戻す。加熱ブロック90, 92の各々の現在の温度はブロック428及び430でI/Oカード118に供給され、表示される。

ブロック432でプログラム200はR時間の値に応じて時間又は温度をチェックすべきかを問合せる。ここではR時間が0である（ブロック402で最後にリセットされている）ので、プログラムはブロック436に分岐し、加熱ブロックの温度をチェックする。連動がオフなので、ブロック436の問合せに続き、ブロック438の状態問合せ、次いでブロック462の状態問合せに進む。サイ

クル／過熱セクション208でプログラム状態フラグは0～10の11個の値をとり得るが、変性セクションを離れると2に設定され（ブロック392）、こうしてプログラムはブロック464で上段加熱ブロックが60℃の低サイクリング温度に達したか否かを問合せる。変性セクション206の終点でこの温度に達したので、（達していないとしてもブロック392でキー=1にセットするので）この時点でキー=1となる。次にプログラム200はブロック476, 478, 484及び490を通してブロック496の問合せに至り、この時点「イエス」であるのでプログラムは「状態変更」サブルーチンに入る。

このプログラム200ではプログラム状態が0又は偶数のときに加熱ブロックは新しい設定温度まで上昇又は下降しており、プログラムはサーミスタ122, 123から供給される温度情報についてI/Oカード118上

のA/D変換器142, 144をポーリングすることが一般に認められる。逆にプログラム状態が奇数であるときには、設定温度に達しているのでプログラムはヒーターブロックが適当な時間にわたって設定温度を維持しているか否かを判定できるようにタイマーをポーリングする。これは図10からも明らかである。

ブロック510の状態変更サブルーチンでは、プログラム状態フラグはブロッ

ク512で(3まで)増分される。ブロック514の答えがノーで且つブロック518の答えがイエスであるので、プログラム200はブロック520でTIMELO(本例では60秒の低サイクリング時間)の値をとるようにR時間を再設定する。プログラムは更に、ブロック522でファンをオフにし、ブロック536でタイマーを始動させた後、ブロック421でサイクル/過熱セクション208の始点

に戻る。

プログラム200はサイクル/過熱セクションの始点を通してブロック432に移る。R時間はここでは所定の値(60秒)をとるので、プログラムはブロック432から分岐し、ブロック550で開始する時間チェックサブルーチンに至る。R時間がまだ経過していない場合には、プログラムはR時間の60秒が時間切れになるまで主ループに戻る。R時間が時間切れしている場合には、ブロック552の問合せに対する答えはイエスであり、従ってプログラム200はブロック555で状態フラグを4に増分し、R時間及びキーを0にリセットした後、ブロック556を介してブロック562に入る。

プログラムが状態4及びブロック562に到達すると、サイクル数フラグはブロック564で増分される(サイクル数=0に設定した本例ではブロック392及び394を介し

てサイクル/過熱ループ208に入ったので1に増分される)。次にプログラムは「サイクル数」フラグについて問合せる。サイクル数フラグがプロトコルパラメータCYCLEMAXとして記憶された最大サイクル数をまだ超えていない場合には、プログラム200はプログラム状態フラグを0にリセットし、変数SETTEMPを高サイクル温度パラメータの値に設定し、次のサイクルを開始するために加熱エレメントをオンにし(ブロック568及び586)、次いでブロック421で主ループに戻る。本例では、CYCLEMAXは8であり、TEMPHIは80℃である。従って、プログラムはSETTEMP=80でブロック421に戻る。

今度は主ループを通してプログラムはブロック424, 428及び430を通り、ブロック432のR時間試験に達する。R時間はブロック555で0にリセットされたので、

プログラムはブロック436に分岐し、加熱ブロックの温度をチェックする。連動がオフなので、ブロック436の問合せ後にブロック438の状態問合せに進み、ここではその答えはイエスである。従ってプログラムはブロック440に移り、加熱ブロックが新しい設定温度に到達したか否かを判定する。到達していないならば、プログラムはブロック444, 460, 462, 476, 478, 484, 490及び496を通して主ループに戻り、ヒーターブロック温度のポーリングを続行する。加熱ブロックが設定温度に達すると、ブロック440の答えはブロック442でキーフラグを1に増分する。ブロック444, 460, 462, 476, 478, 484及び490を通してブロック496に至り、キー=1であるのでプログラムは「状態変更」サブルーチンに分岐する。

ブロック510の状態変更サブルーチンで

は、プログラム状態フラグはブロック512で(1まで)増分され、ブロック514の答えはイエスなので、プログラム200はブロック516でTIMEHIの値(本例では60秒の高サイクリング時間)をとるようにR時間を再設定する。プログラムは更に、ブロック536でタイマーを始動した後、ブロック421でサイクル/過熱セクション208の始点に戻る。プログラム200はサイクル/過熱セクション208の始点を通してブロック432に移る。R時間はここでは所定の値(60秒)をとるので、プログラムはブロック432から分岐し、ブロック550で開始する時間チェックサブルーチンに移る。R時間が経過していない場合には、プログラムはR時間の60秒が時間切れするまで主ループに戻る(ブロック554)。R時間が時間切れすると、ブロック552の問合せに対する答えはイエスになるので、プログラム20

0はブロック555で状態フラグを2まで増分し、R時間及びキーを0にリセッ

トした後、ブロック556に移る。

ブロック556では答えがイエスであるので、プログラムはブロック558で変数SETTEMPを低サイクル温度パラメータ(TEMPL0)の値に再設定し、ブロック560で加熱ブロックを冷却するようにファンをオンにした後、ブロック421で主ループに戻る。

再び主ループに戻り、プログラムはブロック432に達し、R時間は0であるので温度をポーリングするように決定する(ブロック464)。これは所望の(TEMPL0)温度に達するまで続き、この温度に達すると、ブロック466でキーは1に設定される。こうしてプログラムは「状態変更」サブルーチン(ブロック510)に戻り、状態フラグは(3まで)増分され、R時間は加熱ブロック

を所望時間にわたってTEMPL0に維持するようにTIMELOに再設定される。こうしてプログラムはブロック432で時間チェックサブルーチン(ブロック550)に分岐し、タイマーをポーリングする。上記と同様に、R時間が時間切れすると、状態フラグはブロック555で(4まで)増分され、R時間とキーは0にリセットされ、サイクル数フラグは再び評価される。プログラム200はCYCLEMAXに達するまで(例えばブロック564でサイクル数フラグが9まで増分されるまで)プログラム状態0, 1, 2及び3を使用して上述のようなサイクルを実行し続ける。

サイクル数フラグが最大サイクル数を越えると(ブロック566)、プログラム200はブロック570でTEMPSUPERの値を試験する。この値が0ならば、過熱部分をスキップし、ブロック574でプログラム状

態フラグを8に設定する。図示例では、TEMPSUPERの値は110℃であり、ブロック572で変数SETTEMP1を110℃に設定することにより下段リング過熱プロセスを開始した後、421で主ループに戻る。SETTEMP1は下段ブロック単独の設定温度に値をとる変数であり、SETTEMPは連動がオンである場合に上段ブロック又は両方のブロックに適用した。

主ループでは、R時間が0であるので、プログラムはブロック432でもう一

度温度をポーリングし、438及び462の問合せをスキップし、478の問合せにイエスで回答する。プログラムはここで、連動がオフだったならば下段加熱ブロックが上段ブロックよりも低温であり、下段ブロックが上段ブロックの温度に達するまで状態4が維持されると仮定する。ブロック480の問合せの答えがイエスの場合には、キーフラグは1に設定さ

れ、ブロック496、500及び510を介して状態変更が行われる。こうして状態フラグを（5まで）増分し、ブロック526でTIMELEAD値を変数R時間にロードし、ブロック536でタイマーを再始動した後、主ループに戻る。TIMELEAD値は下段加熱ブロック92の過熱から上段加熱ブロック90の過熱が始まるまでの時間である。この例示値は15秒間であり、図10にはT₁～T₂の間の時間により示す。

主ループはこうしてブロック432で時間チェックサブルーチンに分岐し、R時間（=TIMELEAD）が時間切れする時刻を判定した後、プログラム200は状態フラグを（6まで）増分する。状態フラグ=6のとき、プログラムはブロック576で分岐し、ブロック578でTEMPSUPER2の値を変数SETTEMP0にロードし、上段ブロックの過熱を可能にする。SETTEMP0

は（連動がオンのときのように）下段ブロック又は両方のブロックと区別して上段ブロック単独の設定温度の値をとる変数である。主ループに戻ると、プログラムはブロック432で分岐して温度をポーリングし、ブロック484及び486に達し、上段ブロックがその設定温度（TEMPSUPER2）に達しているか否かを試験する。達している場合にはキーフラグはブロック488で1に変更され、プログラム200はブロック510で状態変更サブルーチンに移る。こうして再びプログラム状態を（7まで）増分し、ブロック528を通り、ブロック530で変数R時間をTEMPSUPERの値にし、ブロック536でタイムを再始動する。本例ではTEMPSUPERは30秒であり、上段ブロックが過熱温度に維持される時間に相当する。主ループでブロック432は時間チェックサブルーチンに分岐し、R時間（=TEMPSU

P E R) が時間切れする時刻を判定する。時間切れすると、プログラム200は状態フラグを(8まで)増分し、キーフラグ及びR時間をリセットし、ブロック580に移り、プログラムはブロック582で上段及び下段加熱リングへの温度出力をオフにする。冷却に備えて、ブロック584でプログラムはファンをオンにし、両方の加熱ブロックのS E T T E M P変数をS H U T O F Fの値に再設定する。この値は本例では50℃であり、ファンが加熱ブロックを室温よりも低温に冷却しようとして絶えず運転しないように選択される。

プログラム状態が8でR時間が0にリセットされて主ループに戻ると、プログラムはブロック432で分岐し、温度をポーリングする。ブロック490の答えはイエスであるので、ブロック492でプログラムは上段ブロックの温度をポーリングし、50℃の設定温

度まで冷却しているか否かを判定する。冷却している場合には、ブロック494でキーフラグは1に設定され、ブロック496, 500, 510及び512を介して状態9への状態変更が行われる。ブロック532でプログラムは分岐し、ファンをオフにし(ブロック534)、T I M E I M A G Eの値を変数R時間にロード(ブロック535)した後、タイマーを始動し(ブロック536)、主ループに戻る。上述のように、T I M E I M A G Eパラメータは、ユニットが検出プロセスを開始する前に信号の発生を完了できるように選択される。主ループでブロック432は時間チェックサブルーチンに分岐し、時間切れ後、状態フラグを(10まで)増分し、プログラムはブロック581及び583を介して図11A～11Dに関して後述する検出手順を開始する。

7. ビデオ処理

先の項に記載した検出システム22は、図11A～11Dに示す検出プログラム600などのビデオ処理プログラムを利用する。コンピュータ制御プログラムがプログラム状態=10に達すると、制御が検出プログラム600に送られる。一般に、検出プログラムはデジタルビデオ分析技術を使用して検出システム22のカメラ100により発生される検出手段60(例えばストリップ61)のビ

デオ画像を分析する。好ましくは、ビデオ処理プログラムは下記のように増幅反応全体の精度と信頼性を改善するために、複製物捕獲部位から獲得されるデジタルデータを使用する。しかしながら、まず説明で使用する用語を定義するのが重要である。各検出手段60は図2A、2G及び5A～5Dに示すように少なくとも1個の読取ゾーン68を含む。図2A及び5のデバイスの読取ゾーン68を図12A及び12Bに拡大して示す。検出手

段60は好ましくは参照バー及び／又は対照ゾーン70も含む。

上述のように、各読取ゾーン68は好ましくはアッセイを多重化する目的で多重捕獲部位74を含む。多重化とは、同時に2個以上の分析物のアッセイを実施することを意味し、例えばクラミジア属の生物と淋菌生物の両者を試験したり、遺伝子中の多重部位又は多重遺伝子における遺伝的突然変異を試験することである。多重化は、陽性及び／又は陰性対照試薬と共に1種の分析物を同時にアッセイすることも意味し得る。これらの多重捕獲部位74は図2A及び12Aには連続バンド又は線として示し、図5及び12Bには「スポット」の対角線アレーとして示す。上述の通り、多重捕獲部位は図2Gに示すような不連続バンド又は線でもよい。

これらの多重捕獲部位74は複製物部位72又は複製物ゾーンとして以下に記載する部

位から区別しなければならない。好ましくは、各個捕獲部位74の面積は本明細書中に複製物部位又は複製物ゾーンと呼ぶ数個の「読取ウィンド」を含むのに十分な広さである。これは図12Aには最上段捕獲部位74上の四角で囲んだ面積として示し、図12Bにはスポット74上の多重走査線として示す。図2Gでは、不連続バンドは天然複製物ゾーンを形成するが、連続バンドは読取ソフトウェアによって複製物ゾーンを故意に形成する（図12Aの四角72）。捕獲部位74の各複製物部位又はゾーンは同一分析物に複数の「複製物」アッセイが実施されているかのように同一分析物の付加的データを含むことを理解されたい。複製物部位が複数であるため、統計的「外れ値」を廃棄することができ、信頼性レベ

ルを増し、捕獲部位の画像が正確且つ忠実に評価される。

本発明のビデオ処理構成について説明する

と、コンピュータ26とビデオ処理プログラムは担体61に固定された増幅標的核酸の存在を検出する。一般に、カメラ100は、通常は図8に示す構成の1つに従って担体61の画像を検出する。次いでカメラ100はコンピュータ26のフレームグラバカード116にビデオ信号を出力する。フレームグラバカード116はビデオフレームをデジタル化し、デジタル値をRAM124に記憶する。こうして、デジタル値をコンピュータ26にアクセス可能にし、ビデオ処理プログラム600によって操作することができる。コンピュータ26は512×484画素の解像度をもつ8ビットグレースケールを使用する。0が黒色画像を表し、255が白色画像を表すように各画素に数値を割り当てる。0～255の値は各々特定のグレイ色相を表す。ビデオ信号のデジタル化表現はオペレータに見えるようにコンピュータモニター

113上に表示され得る。

ビデオ処理プログラム600は図11A～11Dのフローチャートにより示す。フローチャートは慣用記号を使用し、ビデオ処理プログラム600によって実施される主機能を表す。ビデオ処理プログラム600は2つの主セクション又はループをもつ。第1のセクションはブロック606で開始する「読取」セクションであり、第2のセクションはブロック634で開始する「アッセイ」セクションであり、読取セクション606のサブルーチンである。読取セクションは各反応／検出ユニット20毎に1回実行し、アッセイセクションは各ユニット20の検出手段60から画像形成された各捕獲部位74毎に1回実行する。

プログラム600はブロック602で開始し、ブロック604で位置カウンタを初期化する。位置カウンタは特定バッチにおける反

応及び検出ユニットの数を記録する。開示の2段環状リング態様では、加熱リング90、92は反応／検出ユニット20を収容する40個のウェル97を含む。

ブロック608はモーター108又は109を次のサンプル読取位置まで前進させる。検出手段60の画像をカメラレンズ102に反射するためにミラー106を使用する検出システム22では、モーター108は各検出手段60の連続画像をカメラ100に送るためにミラーも回転させる。

反応／検出ユニット20は好ましくは、反応サンプル38とユニット20を識別し、この反応／検出ユニットに実施すべきアッセイに関する情報を含むバーコード（図示せず）を備える。バーコードは好ましくは、対照ゾーン70、捕獲部位74及び複製物ゾーン72の存在、位置及び形状（例えばバンド又はスポット）に関する情報など検出手段60の

構成に関する情報をコンピュータ26に提供する。好ましくは、このような構成の数は制限され、構成情報はコンピュータのメモリに記憶され、コンピュータは特定構成に関連するバーコード信号を受け取ると、情報を検索できる。あるいは、ただ1個の構成を使用する場合には、単一参照バーで画像分析用参照フレームを提供し得る。

従って、サイクラー16及び／又はコンピュータ26はバーコードを読取るためのコードリーダー（図示せず）を備える。プログラム600はブロック610でバーコード情報を読取り、バーコードの読取に成功したか否かをブロック612で判定する。読取が不成功の場合には、プログラム600はブロック614でバーコードがこのユニットで読取られなかったことを指示する。捕獲部位の位置及び数を特定するためにバーコード情報を必要とするシステムでは、コンピュータはバー

コードの読取が不成功の場合に特定ユニット20をどのように処理するかわからないので、結果を報告することができず、プログラム200はブロック616に移り、プログラム600はブロック678のサンプル終了ルーチンに移る。読取に成功した場合には、プログラム600はブロック618に移り、デジタル化画像の獲得及び試験に備えてゾーン構成情報を処理する。

ビデオ画像がカメラ100からフレームグラバーカード116に供給されると

、画像はブロック620でデジタル化され、ブロック622で対照ゾーン70を走査される。対照ゾーンは典型的には任意の反応サンプルに対して通常は陽性である規定ゾーンである。対照ゾーンは一般に2つの機能を果たす。第1に、増幅反応と検出チャンバーへのサンプルの移送が適正に行われたことをオペレータに指示する。第2に、バーコード化構成情報

により規定されるような捕獲部位の位置を決定するための参照点を提供する。ブロック624でプログラムは対照ゾーンが検出されたか否かを問合せる。ブロック624の問合せに対する答えがノーであるならば、プログラムは現在のサンプルのエラーコードを指示し、ブロック616に進み、プログラム600はブロック678のサンプル終了ルーチンに進む。ブロック624の問合せに対する答えがイエスであるならば、プログラム600はブロック628に進み、プログラム600はブロック630のアッセイ読取ルーチンに送られる。

アッセイ読取ルーチンはブロック632に移り、ユニットバーコード又は他の入力により提供されるゾーン構成情報を用いて、処理する最初の分析物ゾーンを選択する。各分析物ゾーンは各走査線中に複数の画素をもつ複数の走査線に分割される。各画素はブロック

620のデジタル化手順中にグレースケール数値を割り当てられている。ブロック636でプログラム600は現在の分析物ゾーン中の走査線を試験し、現在の分析物ゾーン中の各走査線毎に画素平均、標準偏差（SD）及び範囲値を計算する。

次にプログラム600はブロック638に移り、現在の分析物ゾーン中の走査線の任意のものが現在の分析物ゾーン中の他の走査線と統計的に相違するか否かを問合せる。ブロック638の問合せに対する答えがノーであるならば、プログラムはブロック640に移り、現在の分析物ゾーンについて陰性結果を報告する。次いでプログラム600はブロック640からブロック642に移り、プログラム600はブロック670の次ゾーンルーチンに送られる。ブロック638の問合せに対する答えがイエスであるならば、プログラムは現在の分析物ゾーンに

陽性結果を検出し

ているのでブロック644に移る。

他の走査線と統計的に相違する走査線はシグナル領域を含む筈であり、他の走査線は含まないことが理解されよう。従って、捕獲部位74と複製物部位72の構成は部位間に所定のスペースを空けなければならないことが理解されよう。これは図12A及び12Bではスペース75によって示す。バンド構成では、バンドはバンド間のスペースを数本の走査線で試験できるように十分離間して配置される。スポット構成では、水平走査線を使用する場合には鉛直スペース75によって隣接スポットを相互に分離すべきである。このスペース75が存在せず、全捕獲部位74が陽性シグナルを生じた場合には、全走査線がシグナルを含み、統計的相違は全く存在しない。

ブロック644はバックグラウンド正規化手順を開始し、プログラムは現在の分析物ゾ

ーンの各走査線が何らかの信号を含むか又はバックグラウンドのみかを分類する。プログラム600は次にバックグラウンドのみとして分類された走査線を用いてブロック646で現在の分析物ゾーンのバックグラウンド勾配を設定し、この勾配を使用して照明及び位置のばらつきを表す。バックグラウンド勾配は当業者に公知の導関数や行列分析などの種々の公知方法で設定することができる。ブロック648でプログラムはバックグラウンド勾配情報を用いて信号走査線のバックグラウンド調節又は正規化を実施する。バックグラウンド正規化は信号基線を設定してデータ翻訳を改善するために従来使用されており、同様に減算又は水平／鉛直平均減算などの種々の公知方法で実施することができる。プログラムは次にブロック648からブロック650に移り、プログラム600はブロック652に送られる。

画像処理サブルーチンはブロック652で開始する。ブロック654でプログラムは輪郭強調を使用して成功複製物部位72におけるシグナル領域77の外周

を識別する。輪郭強調は特徴抽出に公知のデジタル画像処理法であり、ここでは各複製物部位のシグナル領域の輪郭又は境界を画定するのに利用する。ブロック656でプログラムは各複製物部位シグナル領域の外周の内側の全画素の平均、標準偏差及び範囲値を計算する。分析はここでは複製物部位のシグナル領域に集中する。

ブロック658でプログラムはある複製物部位上のシグナル領域統計の任意のものが他の複製物部位72からのシグナル領域統計と有意に相違するか否かを問合せることにより異常結果の有無を識別する。この問合せに対する答えがノーであるならば、全複製物部位72は同一であると判断され、プログラム6

00はブロック660で全複製物部位の内側のシグナル領域の平均画素値を計算し、現在の分析物ゾーンの結果として記憶する。ブロック660からプログラムはブロック662に移り、プログラムはブロック670の次ゾーンルーチンに送られる。

ブロック658の問合せに対する答えがイエスであるならば、プログラム600はブロック664に移り、統計的「外れ値」と呼ばれる異常結果を除去する。異常結果は多数の方法で統計的に定義することができ、平均から著しく離れた結果を含み、ここで「著しく離れた」とは標準偏差の数又は予め設定した信頼性限界内の統計的有意値によって決定される。ブロック666でプログラムは高信頼性試験結果を得るために異常部位を廃棄後に十分許容可能な部位が残存するか否かを判定する。ブロック666で上記判定を実施するためには数種の基準の任意のものを使用する

ことができる。例えば、プログラムは識別した複製物部位の一定百分率（例えば少なくとも50%）が許容可能であることを要求し得る。許容可能な複製物部位の数が設定最小値を上回る場合には、プログラムはブロック660に進み、許容可能な複製物部位内のシグナル領域の平均画素値を計算し、この値を現在の分析物ゾーンの結果として記憶する。許容可能な捕獲部位の数が設定最小値以下の場合には、プログラムはブロック668に進み、現在の分析物ゾーンの不確定結果

フラグを立てる。換言するならば、プログラムはアッセイに関して確実な結末に達するために走査画像内に十分な信頼性をもつデータを検出することができなかった。プログラムは次にブロック668からブロック662に移り、プログラムはブロック670の次ゾーンサブルーチンに送られる。

プログラムは次にブロック672に進み、

現在のゾーンが最後のゾーンであるか否かを問合せる。ブロック672の問合せに対する答えがノーであるならば、プログラムはブロック674で次の分析物ゾーンを選択した後、ブロック676に移り、プログラムはブロック634のアッセイループに戻る。ブロック672の問合せに対する答えがイエスであるならば、現在の反応／検出ユニットの決定が完了し、プログラムはブロック678で開始するサンプル終了サブルーチンに移る。

ブロック680でプログラム600は全サンプル結果を記憶した後、ブロック682で全サンプル結果を表示及び／又は印刷する。あるいは、全データを記憶してランの終了時に印刷するようにプログラムを構成してもよい。次にブロック684で位置カウンタは増分され、プログラムはブロック686で最後の位置が完了したか否かを問合せる。ブロック686の問合せに対する答えがノーである

ならば、プログラムはブロック690に移り、ブロック606の読取ループに戻る。ブロック686の問合せに対する答えがイエスであるならば、プログラムはブロック688で終了する。

本発明のビデオ画像形成態様の使用は好適2段サイクリングエレメントに限定されず、実際には核酸分析などに限定されないことを理解されたい。それどころかビデオ画像形成態様は、カメラ手段、好ましくは何らかの形態の電磁照射を用いてバックグラウンドから区別できるようなシグナルを発生し得る任意のアッセイ形態（例えばイムノアッセイを含む）で利用できる。

8. 核酸増幅及び検出方法

本発明の別の態様によると、核酸増幅及び検出を実施する方法が提供される。発明の背景の項に記載したように、種々の核酸増幅法が当業者に公知である。本

発明が意図する増

幅反応の非限定的な例はP C R、L C R、3 S R及びS D Aである。本発明では増幅反応サンプルは一般に標的核酸、増幅を誘導する少なくとも1種の酵素物質及び緩衝液を含む。本発明が意図する酵素物質の非限定的な例はリガーゼ及びポリメラーゼ並びにその組み合わせである。反応サンプルは後述するプライマー又はプローブを含み得る。好ましくは、プライマー又はプローブは反応サンプル中の標的核酸の量に対してモル過剰量を加える。

当業者に自明の通り、増幅反応の種類に依存して所定の付加的試薬を使用し得る。例えばP C R増幅反応では反応サンプルは一般にヌクレオチド三リン酸、d A T P、d C T P、d G T P及びd T T Pも含む。L C R反応サンプルは通常はN A Dを含む。反応サンプル中のこのような全試薬の量は当業者が経験によって決定し得る。特定増幅反応に用いる

反応サンプルの例については本明細書の実施例4、9及び11に更に説明する。

増幅すべき目的核酸は標的核酸と呼ばれ、デオキシリボ核酸(D N A)でもリボ核酸(R N A)でもよく、その天然又は合成類似体、フラグメント及び／又は誘導體でもよい。標的核酸は好ましくは天然に存在するウイルス核酸又は原核もしくは真核起源のD N Aである。

本明細書中で使用する「プライマー」及び「プローブ」なる用語は一般に、標的核酸と十分にハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドを意味する。「プライマー」なる用語は典型的にはP C Rとの関連で使用し、「プローブ」なる用語は典型的にはL C Rとの関連で使用する。「プライマー／プローブ」なる用語は本明細書中ではプライマー及びプローブ配列の両者に一般論を適用できる場合に使用する。

本発明の方法では、プライマー／プローブは好ましくは標的核酸の種々の部分に相補的となるように選択される。プライマー／プローブの長さは、非限定的な例として増幅反応温度、プライマー／プローブの起源、標的核酸の複雑さ及び増

幅反応の種類を含む種々の因子に依存する。好ましくは、核プライマー／プローブは所望の特異性をもち且つ反応サンプル中に存在し得るランダム配列とのハイブリダイゼーションを避けるために十分な長さとする。より好ましくは、核プライマー／プローブは約15～約100塩基を含み、更に好ましくは約15～約40塩基を含む。

プライマー／プローブは当業者に公知の方法を使用して化学的に合成することができる。好ましくは、プライマー／プローブは当業者に公知のヌクレオチドホスホラミダイト化学技術及び／又はApplied Biosystems, Inc. (Foster C

ity, CA)、DuPont (Wilmington, DE) 又はMilligen (Bedford, MA) から市販されている器具を用いて合成される。

プライマー／プローブはハイブリダイゼーションを妨げない検出可能な標識と直接結合し得る。あるいは、増幅反応で使用する少なくとも1個のプライマー／プローブに特異結合対メンバーを結合する。好ましくは、増幅反応で使用するプライマー対の各プライマー又は1組のプローブの少なくとも2個のプローブに特異結合対メンバーを結合する。より好ましくは、こうしてプライマー対のプライマー又はプローブ組の少なくとも2個のプローブに結合した特異結合対メンバーは2個の異なる特異結合対メンバーである。後述するように、検出可能な標識と結合したりポーター分子と増幅標的を結合するために、プライマー対又はプローブ組に結合した第1の特異

結合対メンバーを使用することができる。その後、第2の特異結合対メンバーを使用して担体61に固定した捕獲分子に標識増幅標的を結合することができる。好ましくは、2個の特異結合対メンバーは相互に交差反応せず、標識リポーター分子又は担体61に固定した捕獲分子と交差反応しない。

典型的には、特異結合対メンバーは抗体又は相補的ポリヌクレオチド配列などの別の分子と結合することが可能な抗原、ハプテン、化合物又はポリヌクレオチドを含む。特異結合対メンバーは更に磁性粒子でもよい。本発明で意図する特異

結合対メンバーの非限定的な例はビオチン、T3、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド及び薬剤化合物（例えばテオフィリン、ジゴキシン及びサリチレート）である。このような特異結合対メンバーは当業者に公知であり、市販されている。

特異結合対メンバーをプライマー／プロー

ブに結合する方法も当業者に公知である。例えば、特異結合対メンバーを共有結合又は標準 β シアノエチルホスホラミダイト化学技術によってプライマー／プローブと結合することができる。Enzo Biochemical (New York) 及びClontech (Palo Alto, CA) もプライマー／プローブ標識法について記載し、市販している。使用する方法は例えば特異結合対メンバーの種類やプライマー／プローブ配列上の結合対メンバーの位置によって異なる。但し、結合対メンバーは増幅反応で使用する温度サイクリングに耐えるように熱安定手段によって結合すべきである。

増幅反応を実施するためには、反応サンプル38を反応チャンバー30に入れる。反応サンプルの量は一般に少量であるため、微量注射器ピペット（図示せず）を使用して反応チャンバー30にサンプル38を入れるか、

又はチャンバーの底にサンプル38を集めるようにチャンバーを短時間遠心すると好適であり得る。次に反応チャンバー30と検出チャンバー32を係合させて密封ユニット20を形成し、ユニット20を熱サイクリングデバイス16、好ましくは図6～8に示し、本明細書に記載するような熱サイクリングデバイス16に入れる。次に、反応サンプル中に存在する標的核酸を増幅するのに十分な温度条件に反応サンプル38を暴露する。PCRやLCRなどの所定の増幅反応では、反応サンプルを熱サイクリングに暴露する。他方、SDAや3SRなどの他の増幅反応は等温条件を使用できる。熱サイクリング条件下で反応サンプルを典型的には設定時間にわたって一定範囲の温度に暴露する。LCRでは、通常は2種の異なる温度で温度サイクリングが行われる。例えば実施例5に記載するように、反応サンプルを85℃と55℃でサイクル

する。当業者は増幅反応を完了するために必要な適切な温度、サイクリング時間及びサイクル数を不当な実験なしに経験によって決定することができる。適当な温度条件下で反応サンプル中に標的核酸が存在すると、プライマー又はプローブは増幅反応が進行するにつれて標的核酸とハイブリダイズする。

増幅反応が完了したら、反応サンプルを反応チャンバー30から検出チャンバー32に移送し、反応サンプル38を担体61と接触させる(図5A~5E)。反応サンプル38を検出チャンバー32に移送する間、ユニット20は密封状態に保たれる。サンプルの移送は蒸気相の形成や、温度上昇によって生じる流体又は推進剤の膨張などの種々の手段によって行うことができる。

好ましくは、検出チャンバー32への反応サンプル38の移送は、反応チャンバー30の下端で推進剤40を膨張させて行われる。

好適態様では、推進剤40の膨張はコンピュータ26によって下段加熱エレメント18(又は加熱エレメント17単独)の温度を推進剤の閾値温度よりも上昇させることにより生じる。より特定的には、反応チャンバー30の第2の長手方向セグメント35に熱を供給するようにコンピュータ26から加熱エレメント17又は18に指令し、こうして推進剤40を推進剤の閾値温度よりも高温に暴露する。典型的には、エレメントは $>95^{\circ}\text{C}$ 、通常は 100°C 以上の温度まで過熱される。こうして反応チャンバー30に供給された熱によって推進剤は膨張し、反応サンプルは検出チャンバー32に向かって上昇する。推進剤40を膨張させるために必要な温度は推進剤40の種類及び組成によって異なる。推進剤40は増幅反応の過程で推進剤40が膨張しないように、増幅反応温度よりも高い閾値温度をもつことが好ましい。

好適態様では、担体61の1つの領域66は反応サンプル中の増幅標的に結合した第1の特異結合対メンバーと結合することが可能な多重複合体分子を含む。複合体分子は当業者に公知の方法を用いて担体61に堆積される。例えば、スポットティングと乾燥により複合体分子を担体61に堆積することができる。好ましくは、カゼインなどの準可溶性タンパク質の存在下で複合体分子を担体61上で

乾燥し、複合体分子の輸送及び再可溶化を助長する。複合体分子は参考資料として本明細書の一部とする米国特許第5, 120, 643号に記載されている方法により担体に堆積することもできる。領域66の複合体分子は担体に固定されず、反応サンプル及び／又は水性溶媒の存在下で再可溶化することができ、毛細管移動によって担体に沿って移動する。上記特異結合対メンバーと結合することが可能な複合体成分の非限定的な例としては、

抗ビオチン抗体、抗テオフィリン抗体、アビジン、炭水化物、レクチン、相補的オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列、ストレプトアビジン及びプロテインAが挙げられる。

こうして担体に堆積された複合体分子を標識と結合する。本明細書中で使用する「標識」なる用語は、検出可能なシグナルを発生するために使用可能な分子を意味する。シグナルは視覚的、光学的又は外部光源による励起によって検出できるべきである。適切な標識は当業者に公知であり、ラテックス、着色ラテックス粒子及びコロイド金属（例えば金又はセレン）などである。あるいは、標識はフルオレセイン、ローダミン、アクリジンオレンジ及びテキサスレッドなどの蛍光分子でもよい。本発明で使用可能なその他の標識は米国特許第4, 166, 105号、米国特許第4, 452, 886号、米国特許第4, 95

4, 452号及び米国特許第5, 120, 643号に記載されている。このような標識は当業者に一般に公知の方法によりリポーター分子と結合することができる〔例えば米国特許第5, 120, 643号、米国特許第4, 313, 734号参照〕。

反応サンプルが上記のように修飾した担体61の第1の領域66と接触するにつれて、特異結合対メンバーと結合した増幅標的核酸は標識リポーター分子と結合する。また、担体上のリポーター分子は再可溶化され、反応サンプル中の増幅標的核酸と共に移動する。上述のように、複合体はストリップ上に存在する必要はなく、検出可能な標識をプライマー／プローブに直接結合する場合には全く不要である。

毛細管移動により、反応サンプルは標識増幅標的と共に担体61の第2の領域68に輸送される。担体61の第2の領域68は好ま

しくは、増幅標的核酸に結合した第2の特異結合対メンバーと結合することが可能な複数の捕獲分子（捕獲部位74）を含む。増幅標的に結合した第2の特異結合対メンバーが磁性粒子である場合には、捕獲分子は磁性吸引によって増幅標的を捕獲及び固定できるように選択すべきである。このような全捕獲分子が担体61に固定される。捕獲分子を担体61に固定する方法は当業者に公知であり、吸着、吸収、共有結合及び米国特許第5,120,643号に記載されている方法などを利用できる。担体61に固定する捕獲分子の量は例えば特異結合対メンバーに対する結合親和性によって異なる。好ましくは、担体61に固定される捕獲分子の濃度は増幅標的に対してモル過剰である。

好ましくは、複数の捕獲分子を担体61上の所定位置又はゾーン（捕獲部位74）で担体61に固定する。捕獲分子は対角線、鉛直

線もしくは水平線構成、円形又は棒状など任意の所望の幾何学的形状又は構成で固定することができる。増幅反応の結果を適切に検出及び解像できるように、このような円又は棒を空間的に分離できることが更に好ましい。

反応サンプルと標識増幅標的が担体61の第2の領域68と接触するにつれて、反応サンプル38中の標識増幅標的核酸は担体61上の固定捕獲分子（捕獲部位74）と結合し、この位置に固定される。捕獲ハプテンをもたないサンプル成分は反応サンプル38の毛細管移動によって第2の領域68から担体61の何らかの付加的ゾーン及び／又は第2の端部64に除去される。

更に、担体61は本明細書中で「対照」ゾーン70と呼ぶ第3の領域も含み得る。対照ゾーン70は検出方法に対照又は参照標準を提供するように修飾される。好ましくは、対照ゾーン70は担体61上の所定の位置で検

出可能な標識を捕獲する所定の試薬を含む。担体61は当然のことながら、別の分析を実施するための付加的領域又はゾーンを含み得る。択一的又は付加的に担

体61は、試薬に対して非反応性であるがカメラによる自動画像形成用参照フレームとして使用される検出可能なシグナルを提供する検出可能な染料を含む参照スポット又はゾーンを含んでもよい。

担体61に固定された標識増幅標的核酸は可視指標を発生し、この可視指標は検出システム22とコンピュータ26により検出及び分析される。こうして発生された可視指標は反応サンプル38中の増幅標的核酸の存在又は量を表す。増幅標的核酸が反応サンプル38中に存在しない場合には、標識増幅標的は固定捕獲分子と結合せず、可視指標は測定されない。担体61上の指標の密度又は強度は任意手段によって光学的に読取ることができる。

る。1態様について本明細書中で記載するように、シグナルは反射ミラー106によってビデオカメラレンズ102に反射される。ミラー106が回転するにつれて、検出チャンバー32の各々における担体61の各々を読取ることができる。

上記好適態様以外に、本発明は標的核酸を標識及び固定する別の方法も意図する。例えば、製造中にプライマー／プローブを検出可能な標識と結合してもよい。あるいは、製造中にプライマー／プローブを特異結合対メンバーと結合し、相補的特異結合対メンバーと結合した検出可能な標識と結合させてもよい。相補的特異結合対メンバーの結合は増幅反応中に行ってもよいし、増幅反応後に行ってもよい。従って、検出チャンバー32に移送する前に反応サンプル中の増幅標的核酸を検出可能な標識に結合できると考えられる。

別の態様では、標識増幅標的核酸を微粒子

凝集によって検出チャンバー32内で検出する。この態様では、製造中に1対のプライマー又は1組のプローブを同一特異結合対メンバーと結合する。次に、相補的特異結合対メンバーと結合した微粒子を検出手段60の一部として加える。反応サンプル38が検出チャンバー38に移送されて検出手段60と接触するにつれて、反応サンプル38中に存在する増幅標的は被覆微粒子と結合する。増幅標的が2価であるため、微粒子は凝集する。非増幅プローブ又はプライマーはた

だ1個の微粒子と結合し、凝集を開始することができない。その後、上述のように検出システム22によって凝集を検出及び分析することができる。

9. 本発明のキット

本発明は核酸を増幅及び検出するキットも提供する。該キットは多重使い捨て反応チャンバー30と、多重使い捨て検出チャンバー

32と、各反応チャンバー30を検出チャンバー32に密封可能に固定する係合手段を含む。使い捨て検出チャンバー32の各々は増幅標的核酸を固定するように修飾した担体61を含む。キットは更に増幅反応を実施するための試薬を適切な緩衝液中に含む1個以上の容器を備える。PCRではこのような試薬はDNAポリメラーゼ、dATP、dCTP、dTTP、dGTP及び所定の標的核酸に特異的な少なくとも2個のプライマーを含む。LCRではこのような試薬はDNAリガーゼ、NAD及び所定の核酸に特異的な少なくとも4個のプローブを含む。試薬に適切な容器はびん、バイアル、試験管などである。好適態様では、選択した試薬をキットの使い捨て反応チャンバー32に事前包装し、穿孔可能なシールで密閉する。

10. 実施例

実施例1：サーマルサイクラーの構成

A. 外径105mm、内径95mm及び高さ13mmの寸法をもつ2つのアルミニウムリングからデュアルリングサーマルサイクラーを構成した。リング間のギャップは2mmとした。各リングは反応／検出ユニット20を収容するための整列ウェルを40個含み、各ウェルは直径約2.3mmとした。図7に示すようにリングの内面に径方向冷却フィンを設けた。粘着性加熱ストリップ(Mincoproducts, Minneapolis, MN)を上下リングの外周に付着した。こうして付着した加熱ストリップは各リングに約300Wの電力を供給することが可能であった。リングの温度は上述のようにエレクトロニクス及びソフトウェアにより制御した。冷却ファンの上方にリングの中心軸に沿って電荷結合デバイス(CCD)カメラと可動ミラーを配置した。

B. 外径105mm、内径94mm及び高

さ36mmの寸法をもつ単一のアルミニウム環状リングからサーマルサイクラーを構成した。リングは反応管用ウェルを36個含み、各ウェルは直径3.5mmとした。リングの内面に径方向冷却フィンを設けた。外周に粘着性加熱ストリップ(Minco Products, Minneapolis, MN)を付着した。リングの温度は上述のように制御エレクトロニクス及びソフトウェアによって制御した。リングの外部にCCDカメラを配置し、中心に光源を配置した。

C. 84mm×25mm×6mmの寸法をもつ2個の矩形アルミニウムブロックから2段式サーマルサイクラーを構成した。各ブロックは反応／検出ユニット20を収容するためのウェルを12個含み、各ウェルは直径約0.31cmとした。ブロックの片面に冷却フィンを設けた。他方の面には粘着性加熱ストリップ(Minco Products,

Minneapolis, MN)を付着した。ブロックの温度は上述のようにエレクトロニクス及びソフトウェアによって制御した。

実施例2：抗体試薬の調製

A. 抗血清： 各ハプテンをBSAに結合してビオチン、アダマンタン、キノリン、ジベンゾフラン、チオフェンカルバゾール及びアクリジンに対する抗血清をウサギで誘起した。アダマンタン、キノリン、ジベンゾフラン、チオフェンカルバゾール及びアクリジンに対する抗体の製造の詳細については、本願と同一名義の同時係属出願第07/808,508号、07/808,839号、07/808,839号、07/808,839号及び07/858,929号に夫々記載されている。これらの出願は参考資料として本明細書の一部とするが、本発明に必須とはみなさない。標準法を使用してマウスでフルオレセインに対するモノクローナル抗体を誘起し

た。ダンシルに対する抗血清はペンシルバニア大学から入手したマウスモノクローナルであった(S-T. FanとF. Karush, Molecular I

mmonology, 21, 1023-1029 (1984))。抗血清をプロテインA Sepharose (登録商標) 又はプロテインG Sepharose (登録商標) (Pharmacia, Piscataway, NJ) に通して精製し、0.1M TRIS (pH7.8)、0.9%NaCl、0.1%BSA、1%スクロース、1%イソプロパノール及びフェノールレッド微量で希釈した。

B. 複合体: D. A. Yost 他 (米国特許第4,954,452号 (1990)) の方法に従ってコロイド状セレンを調製した。545nmで光学濃度=16に達するようにコロイドを水で希釈した。この懸濁液1mLに1mg/mLの抗ビオチン1 μ Lと10

0mg/mLのBSA60 μ Lを加えた。この懸濁液を渦流混合器で1分間混合した。この混合物の0.5mL部分を、4%カゼインを含有する40mM TRIS (pH7.8) 0.5mLで希釈し、10 \times 1.25cmガラス繊維を基材とするパッド (Lypore 9254, Lydall Inc., Rochester, NY) に含浸させた。パッドを凍結乾燥し、6 \times 6mm切片に切断した。

均一に染色した青色ポリスチレンラテックス粒子 (Bangs Laboratories, Carmel, IN) にも抗ビオチン抗血清を結合した。ラテックス粒子 (直径380nm) を水で1:25に希釈し、0.4%固形分で1mLとし、1mg/mLの抗ビオチン10 μ Lを加えた。懸濁液を渦流混合器で45秒間混合し、5%カゼインを含有する0.1M TRIS (pH7.8) 5 μ L

を加えた。この混合物の0.5mL部分を、4%カゼインを含有する40mM TRIS (pH7.8) 0.5mLで希釈し、10 \times 1.25cmパッド (Lypore 254 (登録商標), Lydall, Inc., Rochester, NY) に含浸させた。パッドを凍結乾燥した。

C. 固体担体: 電動微量注射器を用いて抗ダンシル抗体 (1mg/mL) をニトロセルロースシート (Schleicher and Schuell, K

een, NHのMylar (登録商標) にプレキャストした気孔寸法 $5\ \mu\text{m}$ のもの) に加えた。更に、米国特許第4, 877, 745号 (Abbott) に記載されているような試薬噴射によって抗アダマンタン、抗アクリジン、抗キノリン、抗ベンゾフラン、抗チオフエンカルバゾール及び抗フルオレセイン抗体を0.5~1 mg/mLで別々のニトロセルロースシート (

気孔寸法 $5\ \mu\text{m}$ 、Schleicher and Schuell, Keen, NH) に加え、多重捕獲担体を形成した。

実施例3：検出チャンバーの作成

A. 管状： 内径約3 mmのプレキシグラス管から管状検出チャンバーを構成した。検出チャンバーの上端は閉じ、下端は下記実施例4 Aに記載するマイクロチューブ反応チャンバーを螺着できるようにねじ切りした。

実施例2 BのLyda11抗ビオチン複合体パッドを接着テープで抗ダンシルニトロセルロース担体61 (実施例2 C) の底に張り付けた。次にニトロセルロース-Lyda11パッド担体を3×50 mmストリップ状にスライスし、内径約3 mmのプレキシグラス管からなる検出チャンバーにLyda11パッド部分を下向きにして挿入した。

B. レザーバを備える矩形チャンバー： 図2 A~図2 Eに示す設計のストリップホル

ダーをポリカーボネートから成形した。反応管からレザーバに通じる底部のオリフィスに実施例2 Bのセレン抗ビオチン複合体パッドの6×6 mm切片を配置した。抗体を固定した多重捕獲担体ストリップ (実施例2 C) をストリップホルダーに入れた。超音波によってストリップホルダーの底にふたを溶着し、ストリップをピンで固定した。

実施例4：反応チャンバー作成

A. P. C. R. 微量注射器先端をTri-Continent Scientific Inc., Grass Valley, CAから購入し、開放端 (底部) をヒートシールした。これらの反応チャンバーはポリプロピレン製で容積

100 μ L、内径1.8 mmであった。頂部は図13に示すようにねじ切りしてあった。

B. カスタム反応チャンバーはVarivest, Inc., Grass Valley, CAから取りよせた。これらのチャンバーは容積100 μ L、外径3.5 mm、内径2 mm及び長さ3.5 cmを有するようにポリプロピレン毛細管から構成した。奇異なことに、反応サンプルを単独で推進剤として用いた試験では、これらのチューブは既に密封してあった底部を予め融解し、恐らく密閉下端又はその近傍に表面凹凸を導入しない限り、性能が非常に劣った。

実施例5：反応サンプル調製、J 3. 1 1

ABI DNA合成器でホスホラミダイト化学によりオリゴヌクレオチドプローブを合成し、指定するようにビオチン又はダンシルハプテンでハプテン化した。配列（下記配列番号1、2、3及び4）を用いて嚢胞性繊維症に漠然と関連付けられるJ 3. 1 1多型性をコードするヒト染色体7の一部を増幅した。（I. Bartels他, Am J. Hum

man Genetics, 38:280-7 (1986)）。配列は下記のように標的（50塩基合成標的：配列番号5）に整列する。

配 列 番 号

配 列 及 び 整 列

1.	5'-biotin-GTGTTCAGGACCAGCATTCC-3'
2.	GTAAAGGGGAGCAATAAGGT-3'
5.	5'-ATATTGTTGTGTTCAGGACCAGCATTCCGGGAAAGGGGAGCAATAAGGTCA-3'
5'.	(3'-TATAACAACACAGTCCTGGTGCTAAGGCCCTTTCCCTCGTTATTCCAGT-5')
3.	3'-biotin-CACAGTCCTGGTCGTAAG
4.	CCATTTCCCTCGTTATTCCA-dansyl-5'

Backman他のヨーロッパ特許出願第439182号に記載されているような「ダブルギャップ」LCRを実施するために、反応サンプル混合物は総容量100 μ L中に、pH 7.8に達するようにKOHで滴定した50 mM EPPS、20 mM K^+ 、30 mM $MgCl_2$ 、10 μ M NAD、1.7 μ M d

GTP、*Thermus thermophilus*からのDNAリガーゼ9000単位、*Thermus aquaticus*からのDNAポリメラーゼ1単位、ニシン精子キャリアDNA $1\ \mu\text{g}$ 、各オリゴヌクレオチドプローブ（配列番号1、2、3及び4） 4×10^{12} コピー（6.7 nmol）及び標的DNA（配列番号5） 10^7 コピーを含有するものとした。

反応サンプルを実施例4Aの反応チャンバーにピペット注入した。次に反応チャンバーを短時間遠心し、反応サンプルをチャンバー

の底に集めた。反応チャンバーを実施例3Aに記載した検出チャンバーに螺着し、密封反応／検出ユニット20を形成した。

実施例6：DNA増幅及び反応チャンバーから検出チャンバーへの反応サンプルの移送

実施例5の密封反応／検出チャンバーをスプリットリングサーマルサイクラー（実施例1A参照）に挿入した。上段及び下段リングを82℃5秒間及び55℃60秒間の40サイクルの温度プロトコルにかけ、LCR反応を実施した。各サイクルは完了するまでに約2分間を要し、合計LCR時間は約80分間であった。

温度サイクリングの完了後、下段リングを110℃まで加熱し、上段リングを100℃まで加熱した。これらの温度を25秒間維持した。反応チャンバー内の反応サンプルの熱膨張及び蒸発により、サンプルは反応チャン

バーから検出チャンバーに移送され、反応サンプルは標識抗ビオチン複合体を含む担体61の第1の端部と接触した。標識抗ビオチンは再可溶化し、反応サンプルはクロマトグラフィーによりニトロセルロース担体61まで上昇した。増幅標的DNAを含む反応サンプル中で増幅産物は担体61上の抗ダンシル捕獲部位と結合し、可視呈色が観察された。6個の反応サンプルの結果を図13に示す。左側の3個のサンプルは標的DNAを含み、検出スポット上に暗色スポットが見える（矢印参照）。右側の3個のサンプルは標的DNAを含まず、スポットは見えない。

実施例7：検出画像形成

輝度140及びコントラスト150のグレースケール設定を用いて実施例6の検出チャンバーをフラットベッドスキャナー（ScanJet C, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA）でTIFF

Fファイルに走査した。TIFFファイルをImage（登録商標）（National Institutes of Health, Research Services Branch, NIHの市販品）にインポートし、生成されたバンドの画像の画素密度を分析した。結果を下表1に示し、表中、最大密度及び最小密度はバンドのすぐ近傍の画像のグレーレベルを表す。

表 1

	ストリップ1	ストリップ2	ストリップ3	ストリップ4	ストリップ5	ストリップ6
	(陽性)	(陽性)	(陽性)	(陰性)	(陰性)	(陰性)
最大密度	183	203	210	164	159	183
最小密度	143	147	186	135	129	159
差	40	56	34	29	30	24

実施例8：ビデオ処理

実施例6に記載した呈色反応生成物の写真画像をCCDカメラで撮影した。上述のソフ

トウェアを使用して画像から生成されたグレースケールデータファイルを分析して担体61の特定領域中の呈色反応の有無及び量を判定した。

実施例9：アルコール推進剤

1-プロパノール2 μ Lを反応チャンバーの下端に入れ、反応サンプルと1-プロパノールを約2.5 μ Lの空気で分離するように反応サンプルをチャンバーに入れた以外は実施例5と同様の反応サンプルを微量注射器筒反応容器で調製した。次に実施例5と同様に反応チャンバーに検出チャンバー32を密封可能に装

着し、密封反応／決定ユニット20を形成した。上段及び下段リングの両者を100℃まで加熱した以外は実施例6と同様のDNA増幅及び後加熱プロトコルを実行した。1-プロパノールを蒸発させ、反応サンプルを上昇させて検出チャンバー内の担体61と接触させた。その後、実施例7又は8に記

載した画像形成検出システムにより担体ストリップ61上の呈色反応生成物を分析することができる。

実施例10：推進剤膨張の核形成

数個のガラスマイクロビーズ（平均直径0.2mm）（均質化ビーズ、Virtis Corporation, Gardiner, NY）を加えた以外は実施例5と同様の反応サンプルを調製した。次いで実施例6及び7に記載したステップを実施した。ガラスビーズは反応チャンバーの下端で沸騰の開始及び局在化のための核として機能し、こうして発生した蒸気は反応サンプルを検出チャンバーに移送するように機能する。その後、実施例7に記載した画像形成検出システム及び手順により担体ストリップ61上の呈色反応生成物を分析した。

実施例11：反応サンプル調製、βグロビン

ヒトβグロビン遺伝子（配列番号10）とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ（配列番号6、7、8及び9）をABI DNA合成器でホスホラミダイト化学によって合成し、ビオチン又はアマダンタンでハプテン化した。

配列番号

配列及び整列

6.	5'-adam-GGGCAAGGTGAACGTGGA	
7.		GAAGTTGGTGGTGAGGCC-biotin-3'
10.	5'-CCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGG-3'	
10'.	(3'-GACACCCCGTTCCACTTGCACCTACTCAACCACCACTCCGGGACCC-5')	
8.	3'-CCCGTTCCACTTGCACC	
9.		ACTTCAACCACCACTCCGG-biotin-5'

Backman他のヨーロッパ特許出願第0439182号（1991）に記載されている所謂「ダブルギャップ」LCR法を実施するために、反応サンプル混合物は総容量100μL中の最終濃度で表した場合に、50mM EPPS

pH 7.8、pH 7.8及び20mM K^+ に達するようにKOHで滴定したKCl、30mM $MgCl_2$ 、10 μ M NAD、1.7 μ M dGTP、(Thermus thermophilusからの)DNAリガーゼ9000単位、(Thermus aquaticusからの)DNAポリメラーゼ1単位、及び各オリゴヌクレオチド(配列番号6、7、8及び9) 1×10^{12} コピー(1.7pmol)を含有するものとした。標的はヒト胎盤DNA 250ng(約 10^5 コピー)であり、配列番号10又は水を含む。

底部を融解して冷却しておいた実施例4Bの100 μ L容反応チャンバーに反応混合物

をピペット注入した。反応チャンバーを短時間遠心して反応混合物を管の底部に集めた。チューブに実施例3Bの検出ユニットを装着し、密封反応/検出ユニットを形成した。

実施例12：DNA分析及び反応チャンバーから検出チャンバーへの反応サンプルの移送

実施例11で組立てた反応/形成ユニットを実施例1Bのサーマルサイクラーに挿入し、88℃10秒間と53℃60秒間の35サイクルからなる温度シーケンスにかけ、LCR反応を実施した。各サイクルを完了するには約2分間を要し、合計LCR時間は約80分間であった。増幅サイクルの完了後、リングを104℃まで加熱した。この温度を25秒間維持した。反応混合物の熱膨張と蒸発により、液体サンプルは各反応エレメントから夫々に装着した検出エレメントに流入し、増幅サンプルは抗ビオチン複合体を含む乾燥パ

ッドに侵入した。パッド中の標識抗体は可溶化し、混合物はクロマトグラフィーによりニトロセルロースストリップまで上昇した。試験サンプル中に適当なDNA配列が存在する場合には、増幅産物は抗アマダンタン捕獲部位に保持され、可視呈色が観察された。他の抗体部位は呈色しなかった。反応ユニットは図14に示す。

実施例13：ビデオ処理

実施例 1 1 及び 1 2 の反応／検出ユニットを実施例 7 及び 8 の手順に従って画像形成及び処理した。

実施例 1 4：多重担体

各々異なるハプテンに対して特異的な複数の抗体結合部位をもつ担体ストリップ 6 1 を実施例 3 B に記載したように作成した。ストリップは担体上の特定位置にビオチン標識卵アルブミンも含む。ビオチン標識タンパク質は対照又は参照標準として用いる。

実施例 1 5：多重検出

実施例 5 又は 1 1 に記載したようにオリゴヌクレオチドプローブを合成する。

- ・ 実施例 1 1 の 4 個のプローブはヒト β グロビン遺伝子とハイブリダイズする。プローブの 2 個は抗ビオチンラテックス複合体と結合できるように末端ビオチン部分を含み、1 個は担体ストリップ上の特異結合ゾーンで抗アマダンタンと結合できるように末端アマダンタンを含む。これは陽性対照として用いる。

- ・ 他の 4 個のプローブは天然には知られていない配列とハイブリダイズする。プローブの 2 個は抗ビオチンラテックス複合体と結合できるように末端ビオチン部分を含み、2 個は担体ストリップ上の特異結合ゾーンで抗ジベンゾフランと結合できるように末端ジベンゾフランを含む。これは陰性対照として用いる。

- ・ 他の 4 個のプローブは嚢胞性繊維症の ΔF_{508} 突然変異をコードするヒト染色体 7 の部分とハイブリダイズする。プローブの 2 個は抗ビオチンラテックス複合体と結合できるように末端ビオチン部分を含み、2 個は担体ストリップ上の特異結合ゾーンで抗フルオレセインと結合できるように末端フルオレセインを含む。

- ・ 他の 4 個のプローブは嚢胞性繊維症の $G_{551}D$ 突然変異をコードするヒト染色体 7 の部分とハイブリダイズする。プローブの 2 個は抗ビオチンラテックス複合体と結合できるように末端ビオチン部分を含み、2 個は担体ストリップ上の特異結合ゾーンで抗チオフエンカルバゾールと結合できるように末端チオフエンカルバゾールを含む。

- ・ 他の4個のプローブは嚢胞性繊維症のG₅₄₂ X突然変異をコードするヒト染色体7の部分とハイブリダイズする。プローブの2個は

抗ビオチンラテックス複合体と結合できるように末端ビオチン部分を含み、2個は担体ストリップ上の特異結合ゾーンで抗キノリンと結合できるように末端キノリンを含む。

- ・ 他の4個のプローブは嚢胞性繊維症のW₁₂₈₂ X突然変異をコードするヒト染色体7の部分とハイブリダイズする。プローブの2個は抗ビオチンラテックス複合体と結合できるように末端ビオチン部分を含み、2個は担体ストリップ上の特異結合ゾーンで抗ダンシルと結合できるように末端ダンシルを含む。

これらの突然変異の各々の周囲のDNA配列は文献に記載されている。次に実施例5～6及び11～12の条件を用いてLCR増幅を実施し、ストリップを展開し、実施例7～8に記載したようにスポットを視覚化する。

実施例16：多重ビデオ処理

各抗体（又はビオチン標識タンパク質）がストリップ上の3個以上の特異位置に結合す

る以外は、実施例11と同様に担体ストリップ61を作成する。複数の特異捕獲部位74又は結合領域により、ビデオ処理プログラム600は類似スポットからのシグナルを平均し、こうして特定結果の付値の信頼性を増すことができる。更に、類似スポットが呈色しない場合にはスプリアスシグナルを棄却することができる。

以上、本発明の好適態様について説明したが、当業者に自明の通り、本発明の実際の範囲内で構造、構成、組成等の変更が可能である。本発明の保護範囲は添付の請求の範囲により定義される。

配 列 表

配 列 番 号 : 1

配 列 の 長 さ : 1 9

配 列 の 型 : 核 酸

鎖 の 数 : 1 本 鎖

トポロジー : 直鎖状

配 列 の 種 類 : 他 の 核 酸 (合 成 D N A)

配 列

GTGTCAGGAC CAGCATTCC

19

配 列 番 号 : 2

配 列 の 長 さ : 2 0

配 列 の 型 : 核 酸

鎖 の 数 : 1 本 鎖

トポロジー : 直鎖状

配 列 の 種 類 : 他 の 核 酸 (合 成 D N A)

配 列

GTAAAGGGGA GCAATAAGGT

20

配 列 番 号 : 3

配 列 の 長 さ : 1 8

配 列 の 型 : 核 酸

鎖 の 数 : 1 本 鎖

トポロジー : 直鎖状

配 列 の 種 類 : 他 の 核 酸 (合 成 D N A)

配 列

GAATGCTGGT CCTGACAC

18

配 列 番 号 : 4

配 列 の 長 さ : 2 1

配 列 の 型 : 核 酸

鎖 の 数 : 1 本 鎖

トポロジー : 直鎖状

配 列 の 種 類 : 他 の 核 酸 (合 成 D N A)

配 列

ACCTTATTGC TCCCCTTTAC C

21

配 列 番 号 : 5

配 列 の 長 さ : 5 0

配 列 の 型 : 核 酸

鎖 の 数 : 2 本 鎖

トポロジー : 直鎖状

配 列 の 種 類 : ゲノムDNA

配 列

ATATTGTTGT GTCAGGACCA GCATTCCGGG AAAGGGGAGC AATAAGGTCA 50

配 列 番 号 : 6

配 列 の 長 さ : 1 8

配 列 の 型 : 核 酸

鎖 の 数 : 1 本 鎖

トポロジー : 直鎖状

配 列 の 種 類 : 他 の 核 酸 (合 成 DNA)

配 列

GGGCAAGGTG AACGTGGA 18

配 列 番 号 : 7

配 列 の 長 さ : 1 8

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

GAAGTTGGTG GTGAGGCC

18

配列番号：8

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

CCACGTTAC CTGCCC

17

配列番号：9

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖 の 数 : 1 本 鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成 DNA)

配列

GGCCTCACCA CCAACTTCA

19

配列番号 : 1 0

配列の長さ : 4 7

配列の型 : 核酸

鎖 の 数 : 2 本 鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ゲノム DNA

配列

CCTGTGGGGC AAGGTGAACG TGGATGAAGT TGGTGGTGAG GCCCTGG

47

【図1】

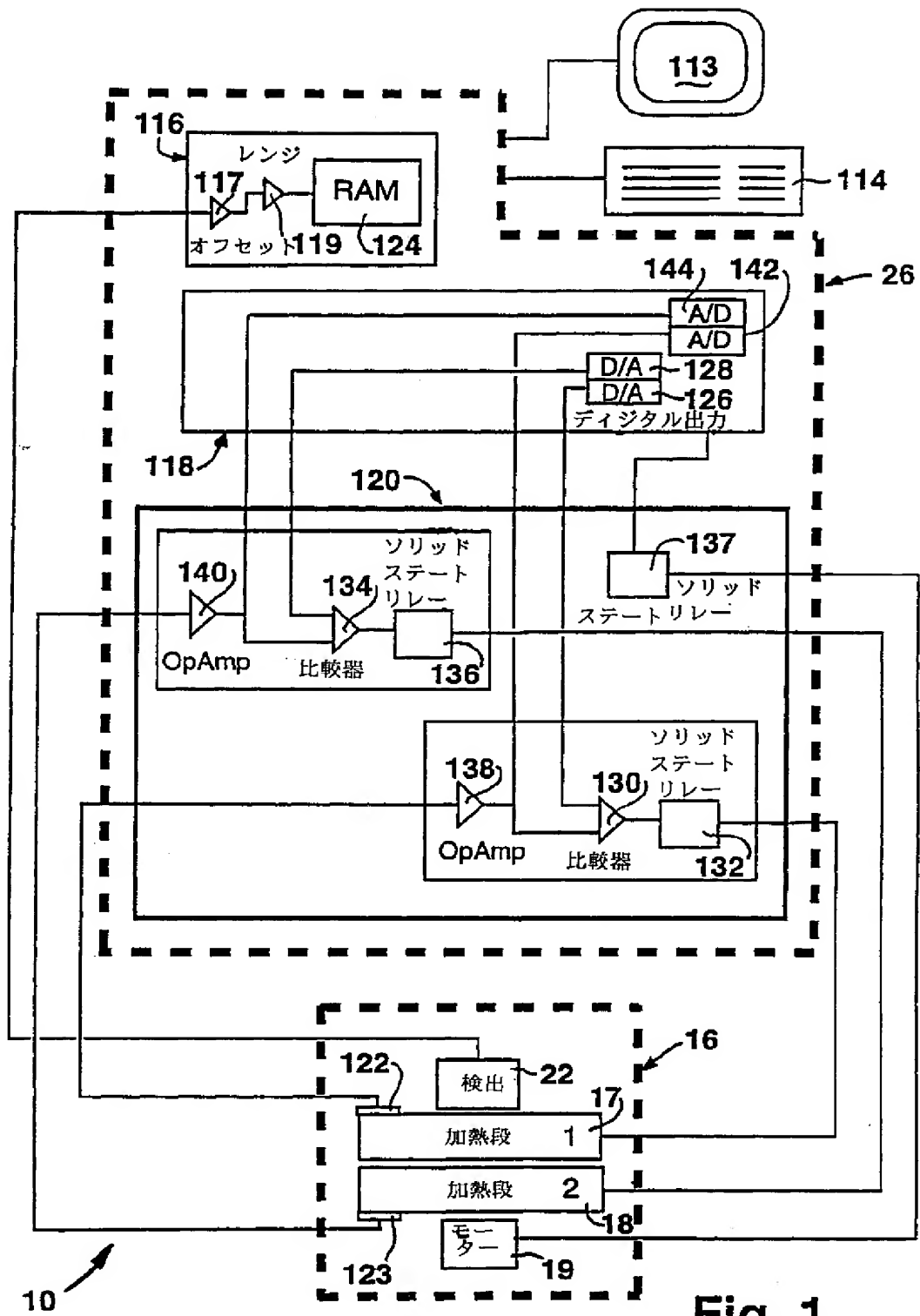
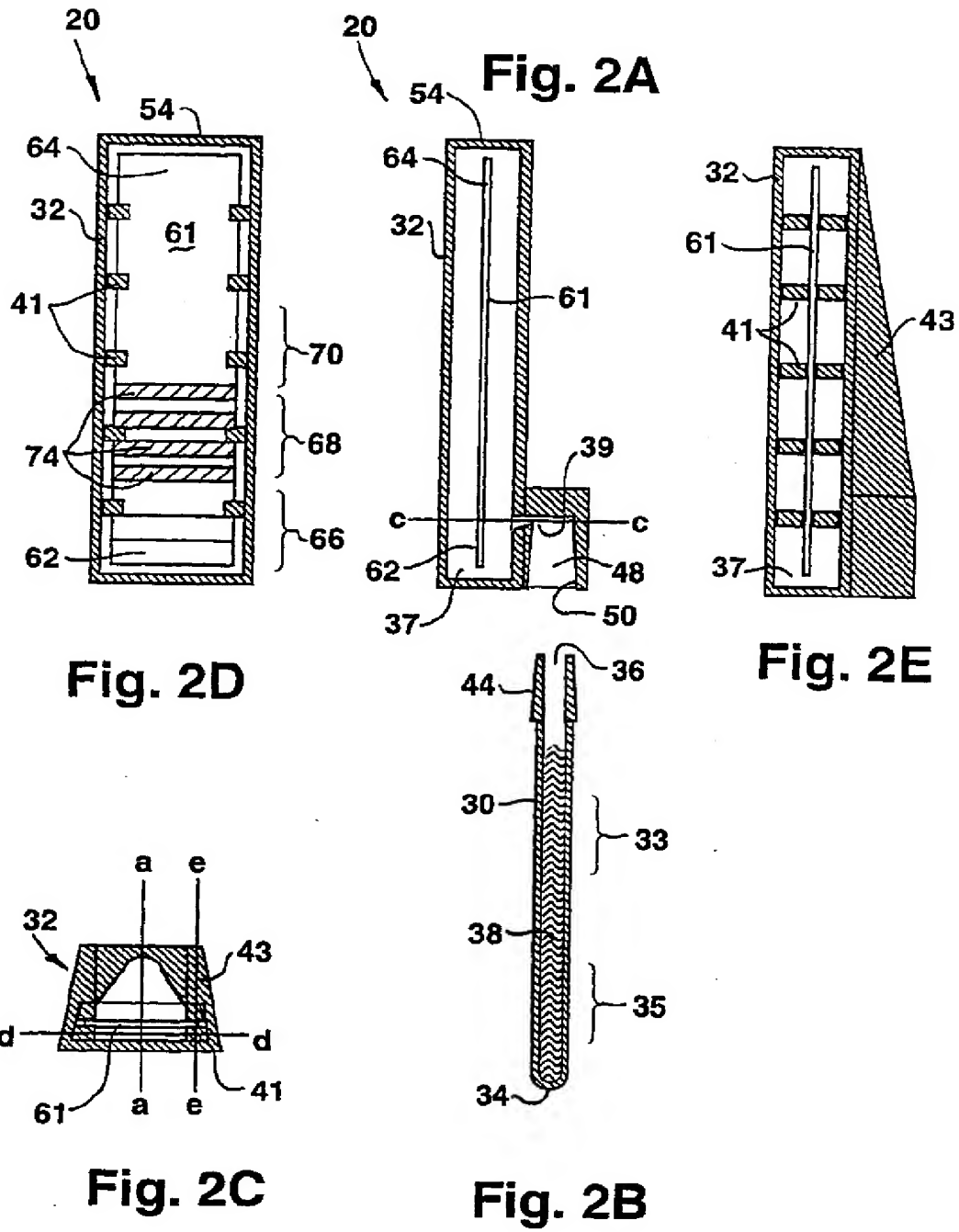
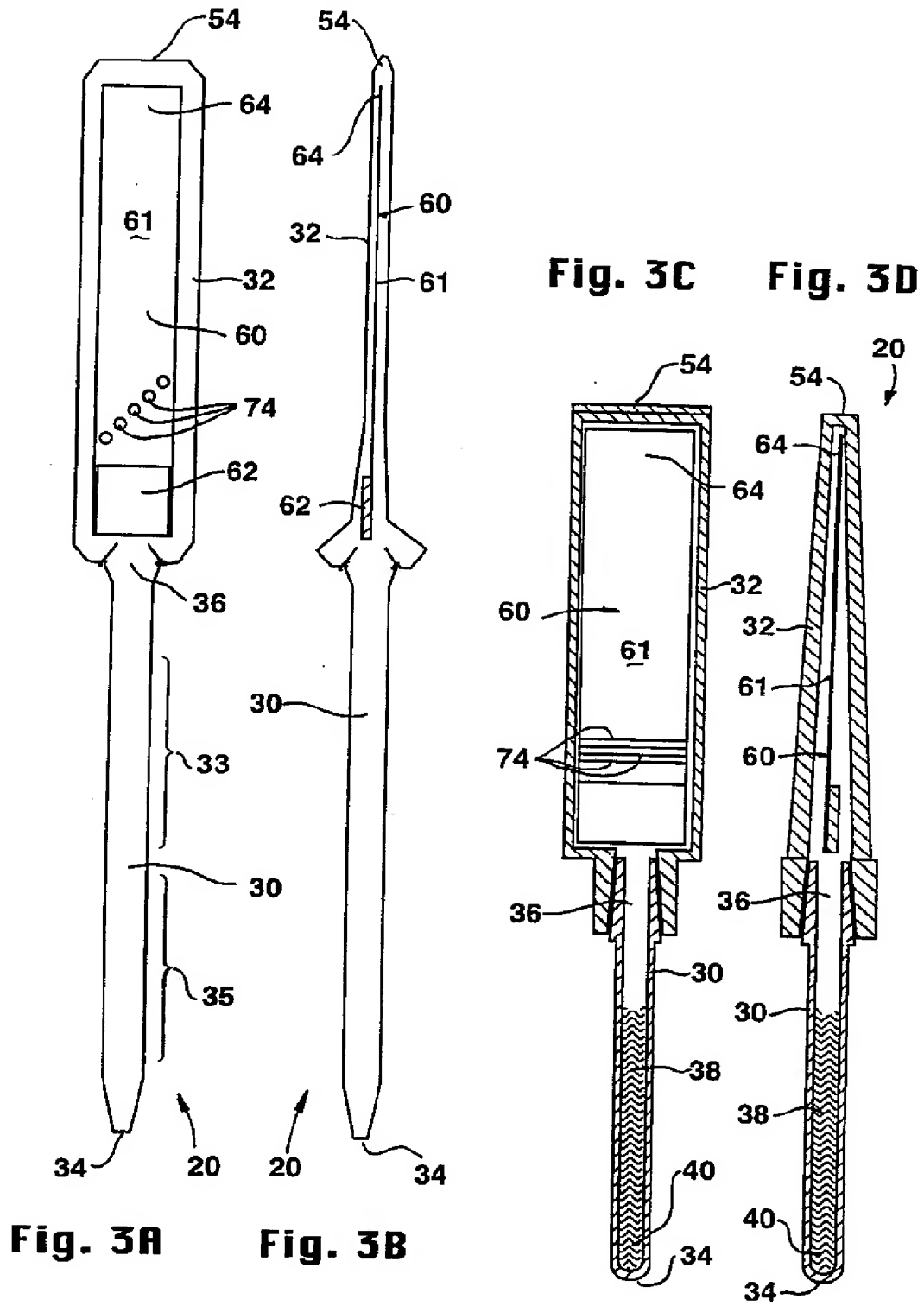


Fig. 1

【図2】



【図3】



【図4】

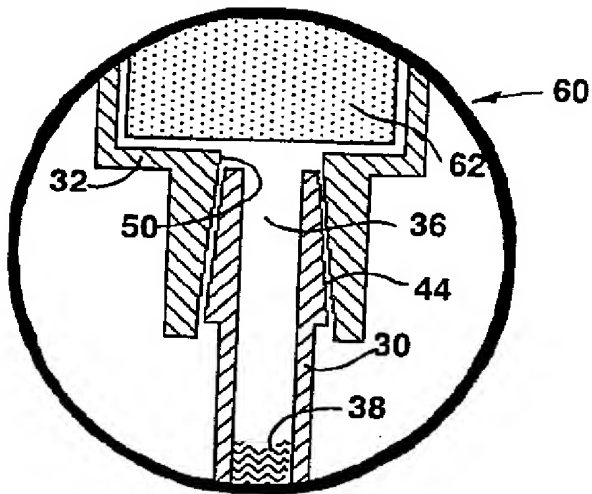


Fig. 4A

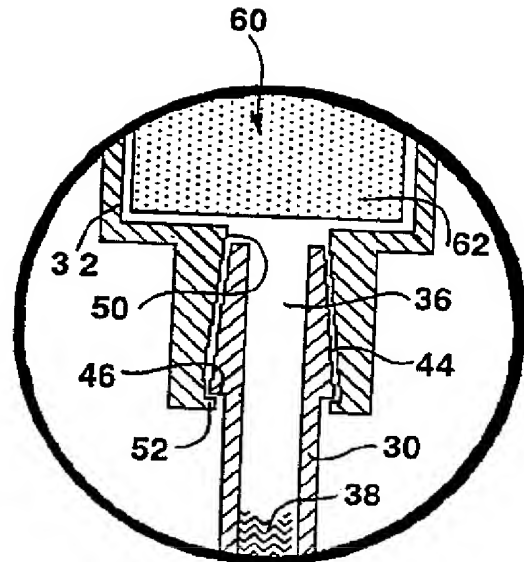


Fig. 4B

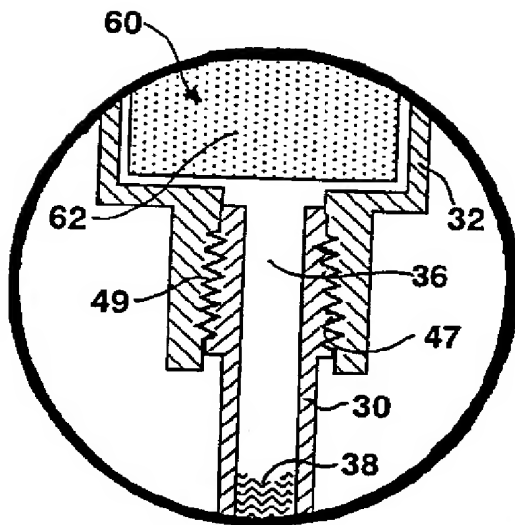


Fig. 4D

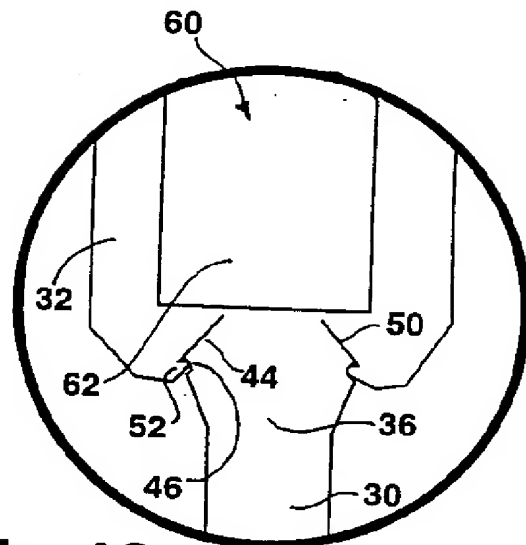


Fig. 4C

【図5】

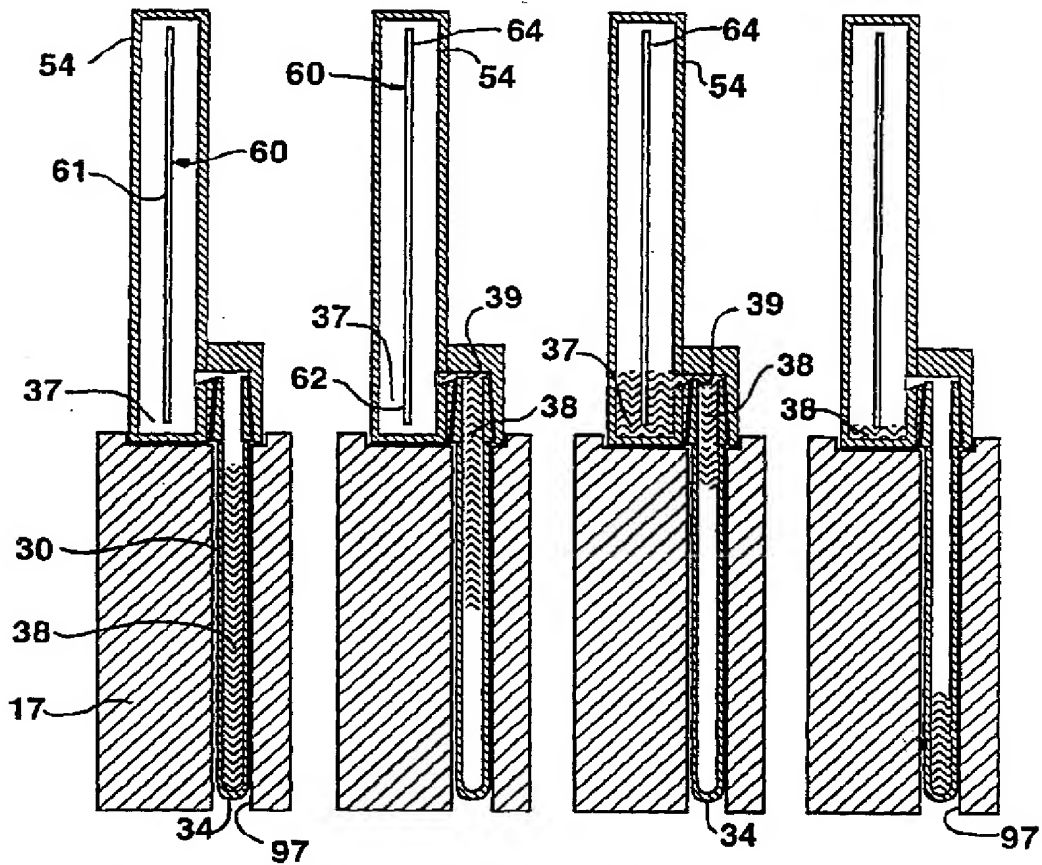
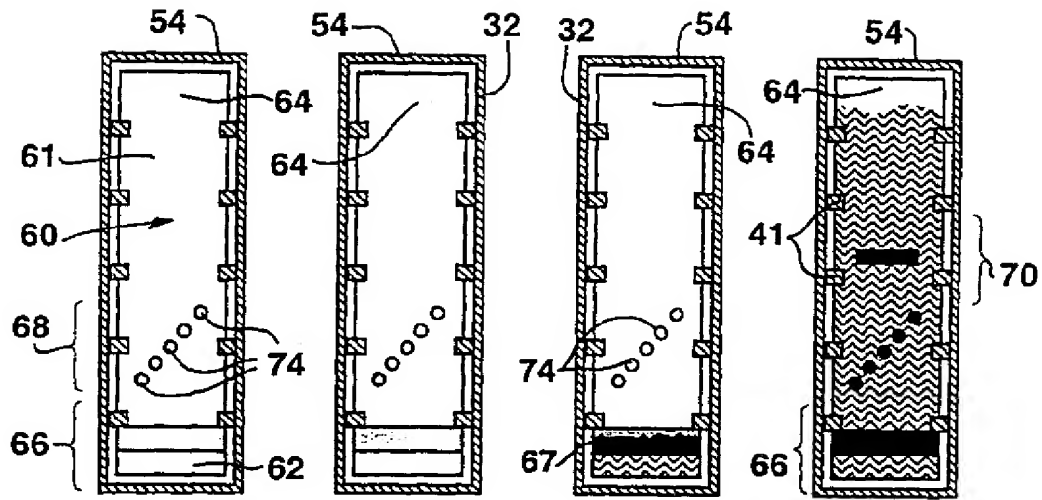


Fig. 5A Fig. 5B Fig. 5C Fig. 5D

【図6】

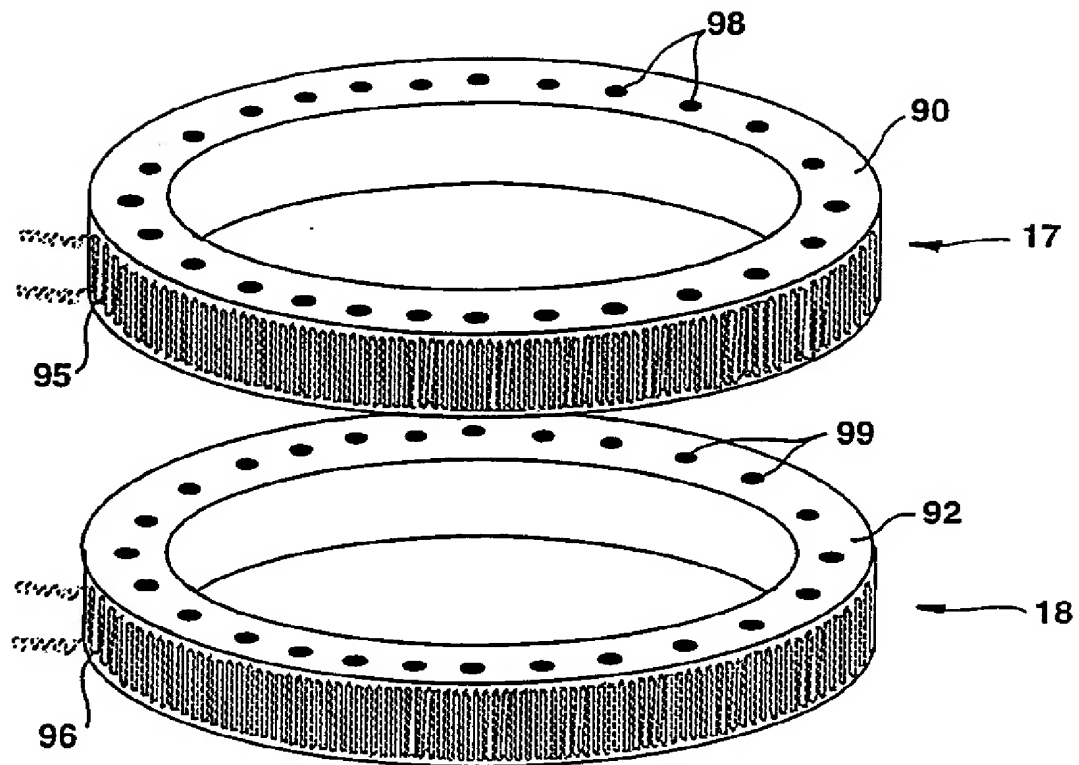


Fig. 6

【図7】

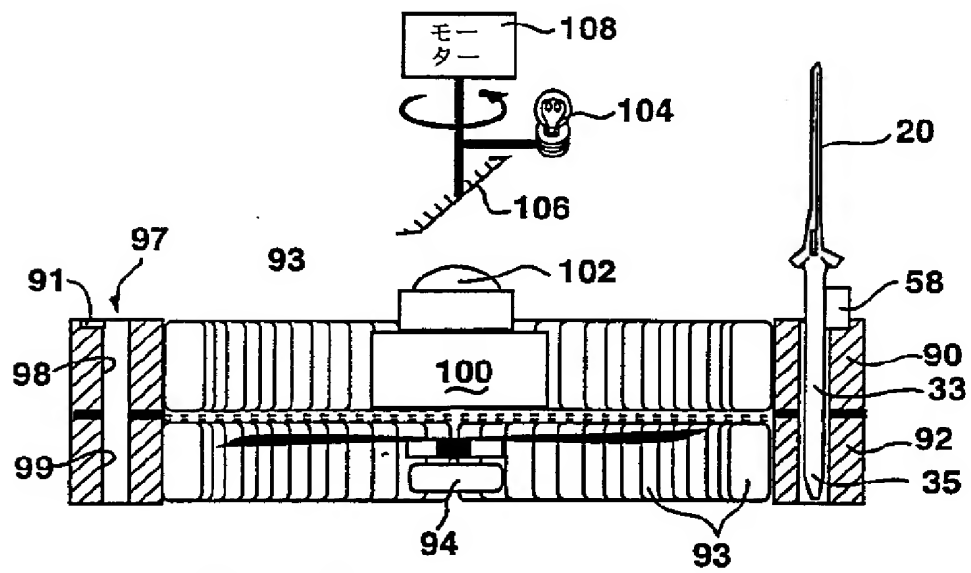
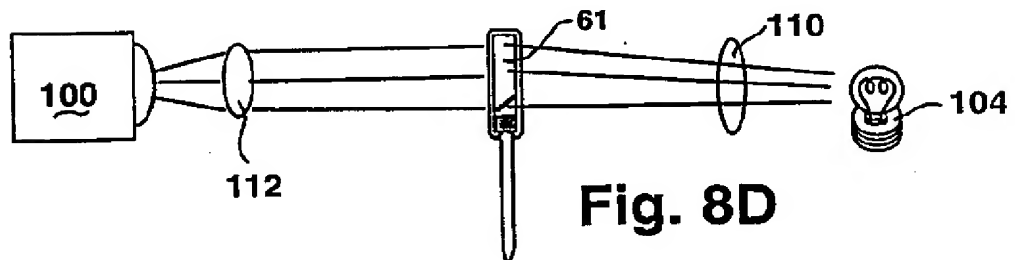
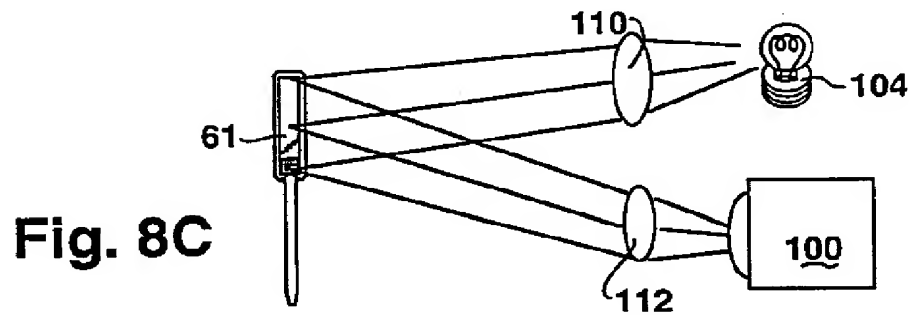
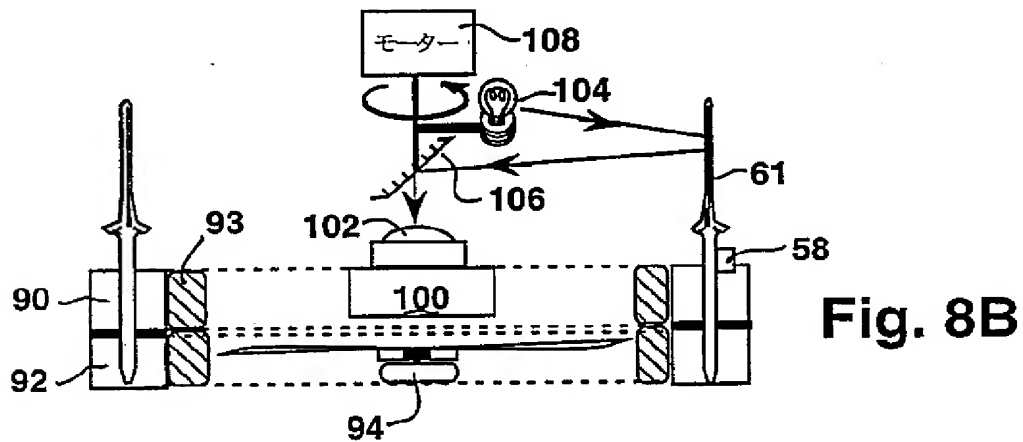
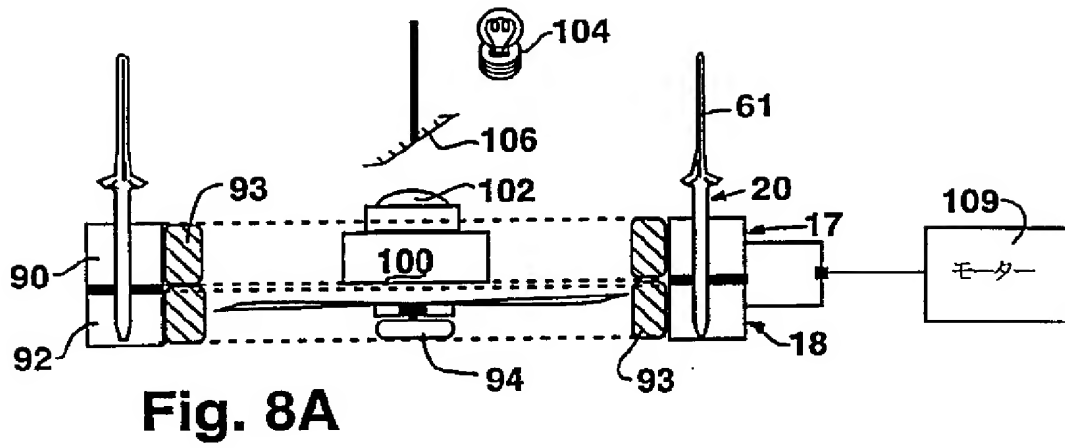


Fig. 7

【図8】

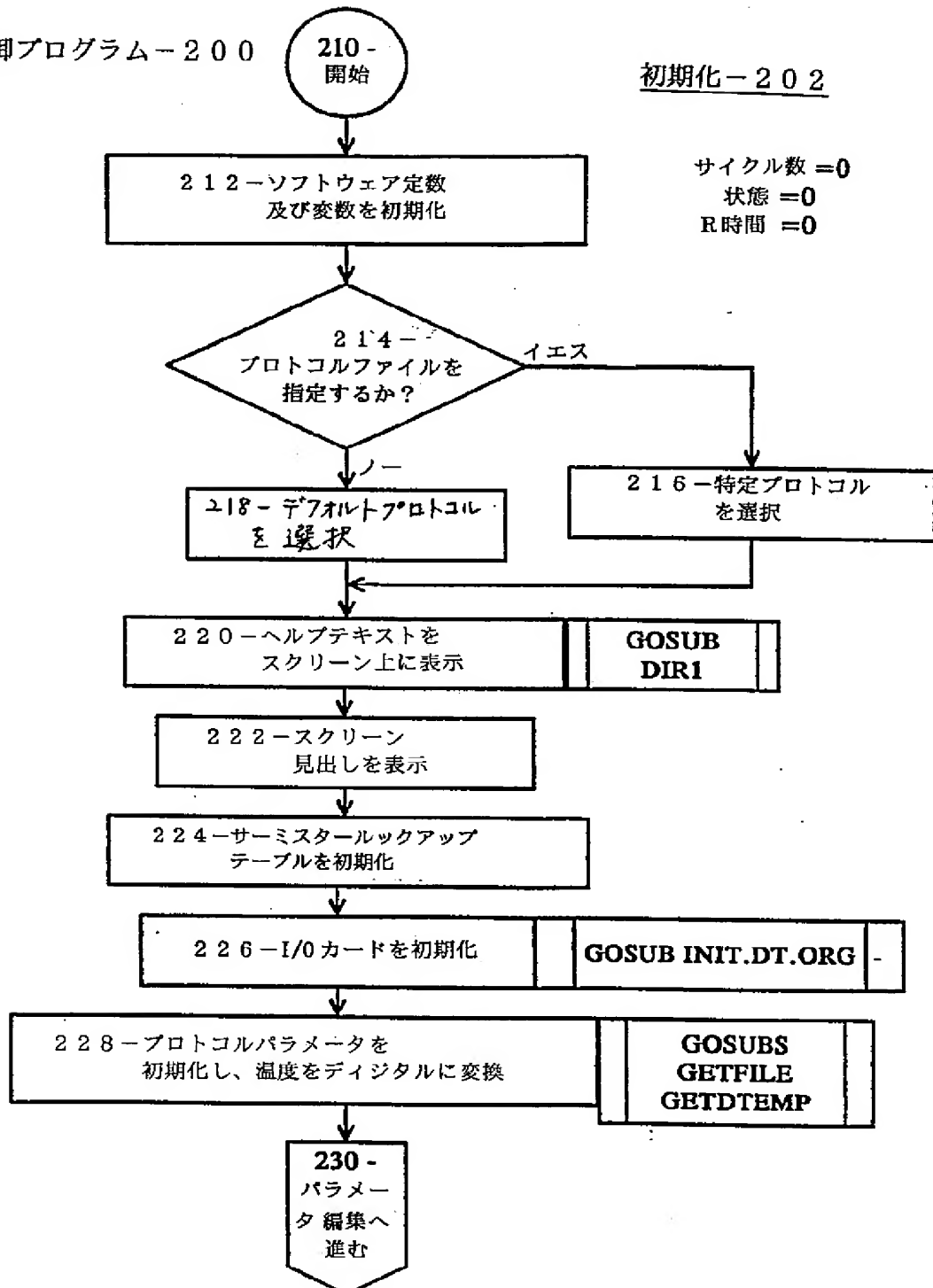


【図9】

熱制御プログラム-200

210 -
開始

初期化-202



【図9】

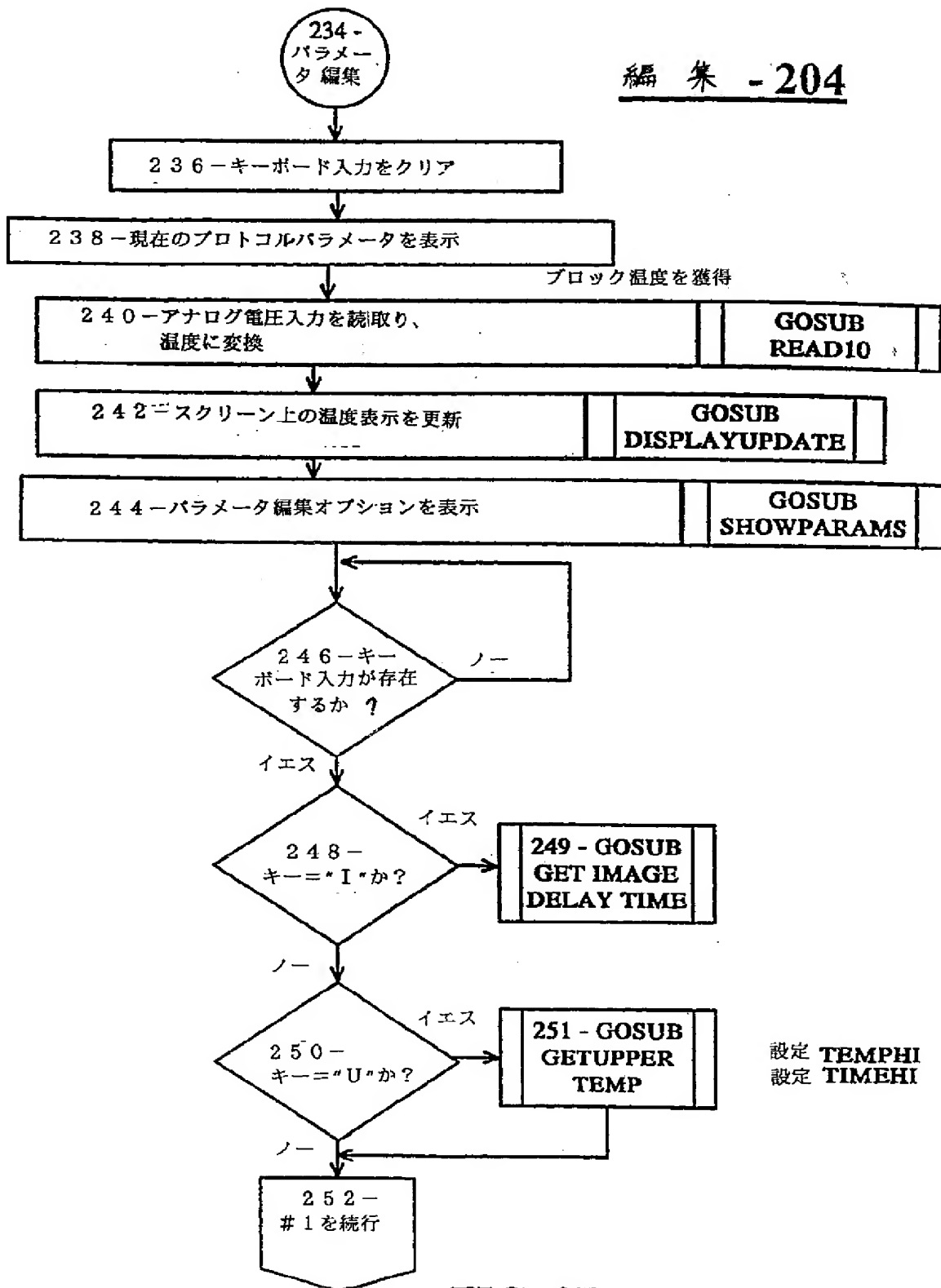
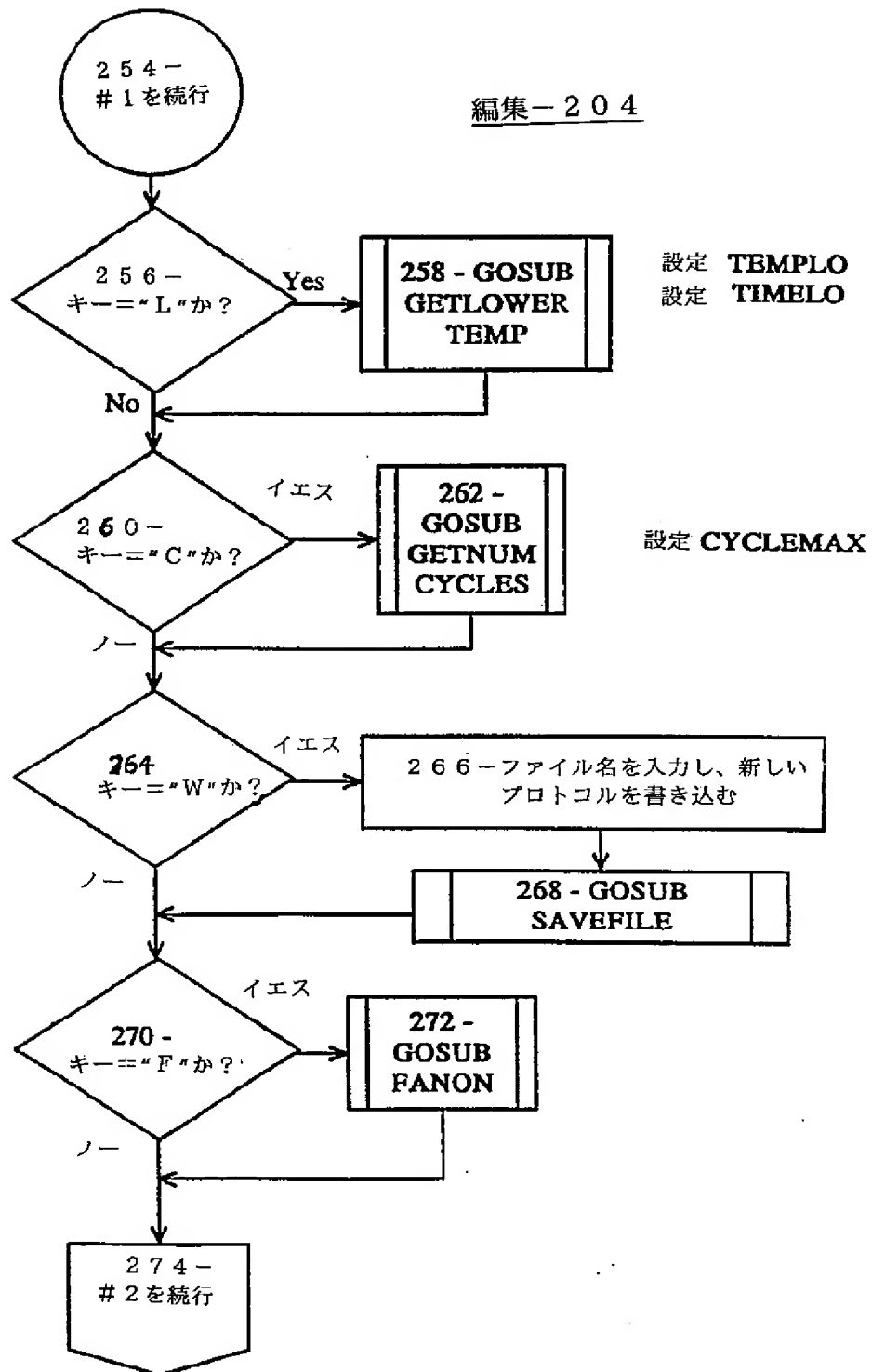


FIG. 9B

【図9】



【図9】

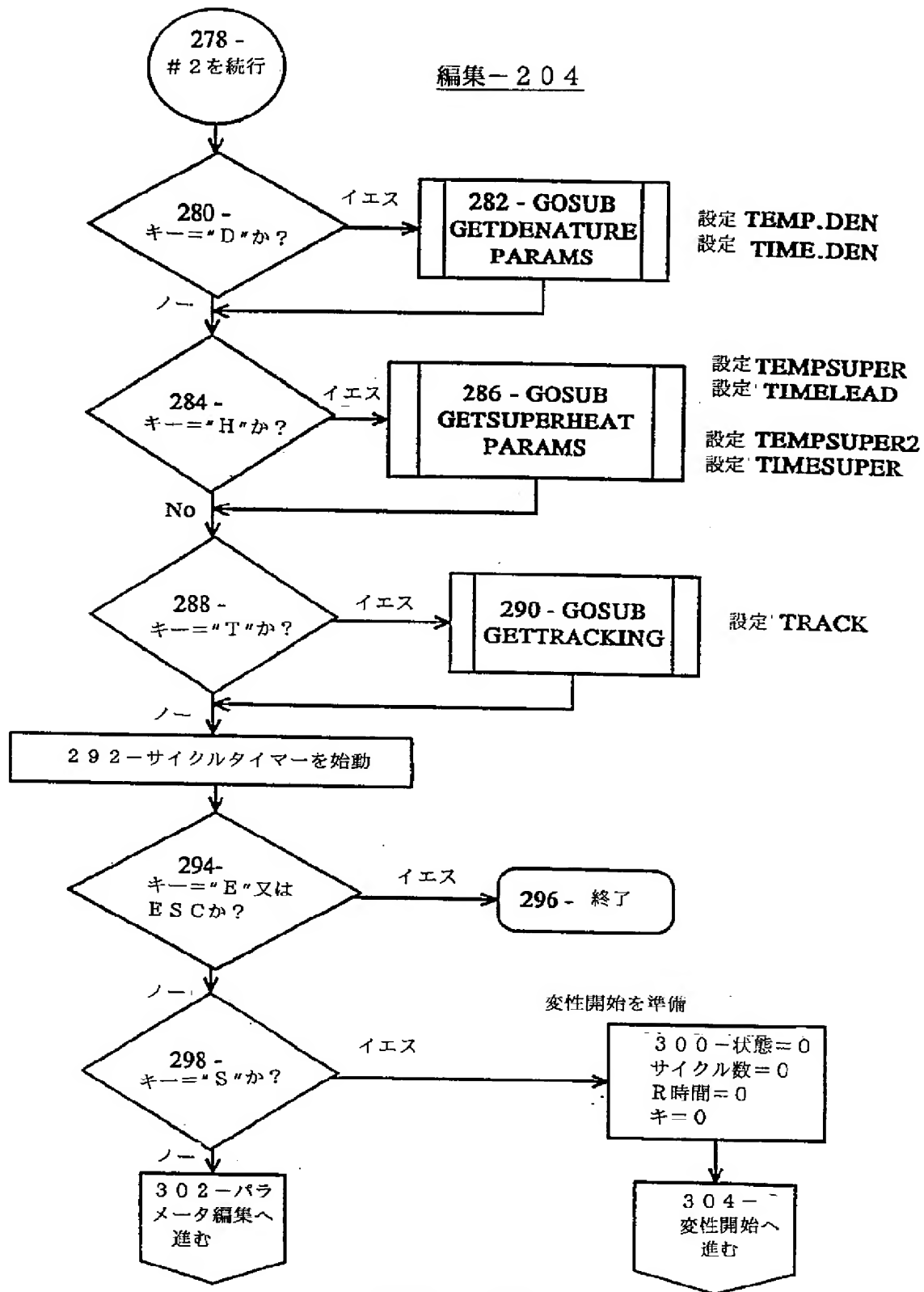


FIG. 9D

【図9】

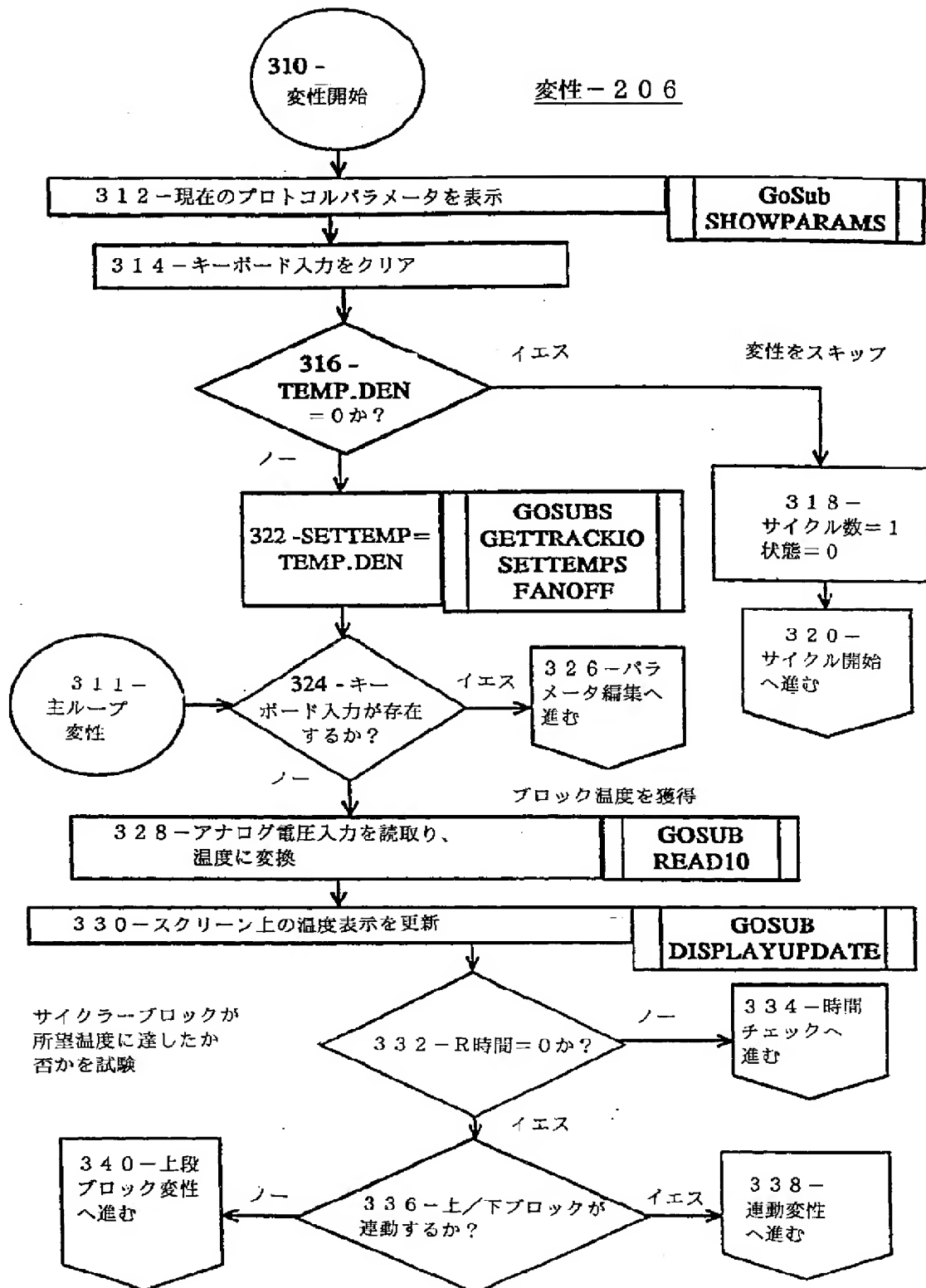
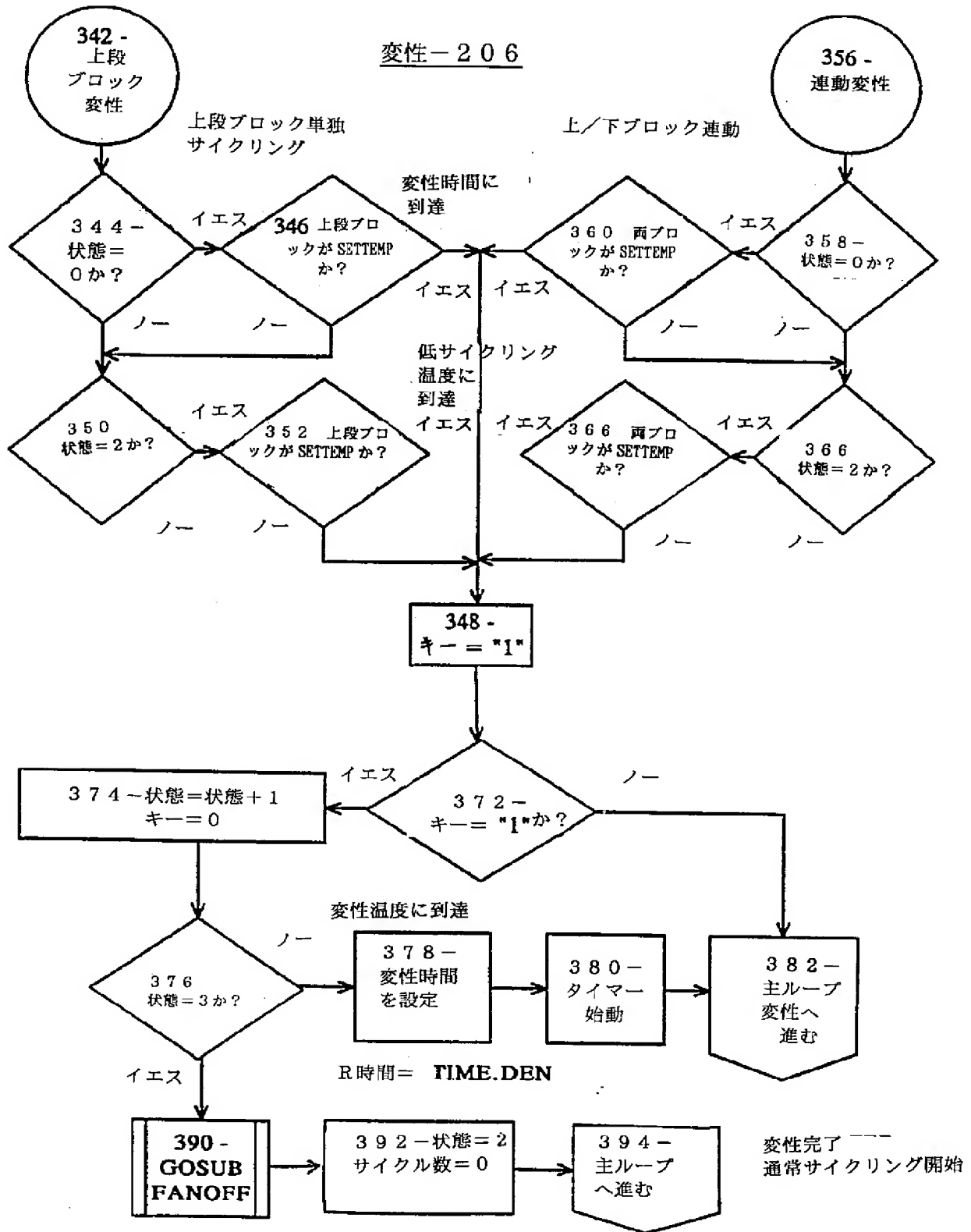


FIG. 9E

【図9】



【図9】

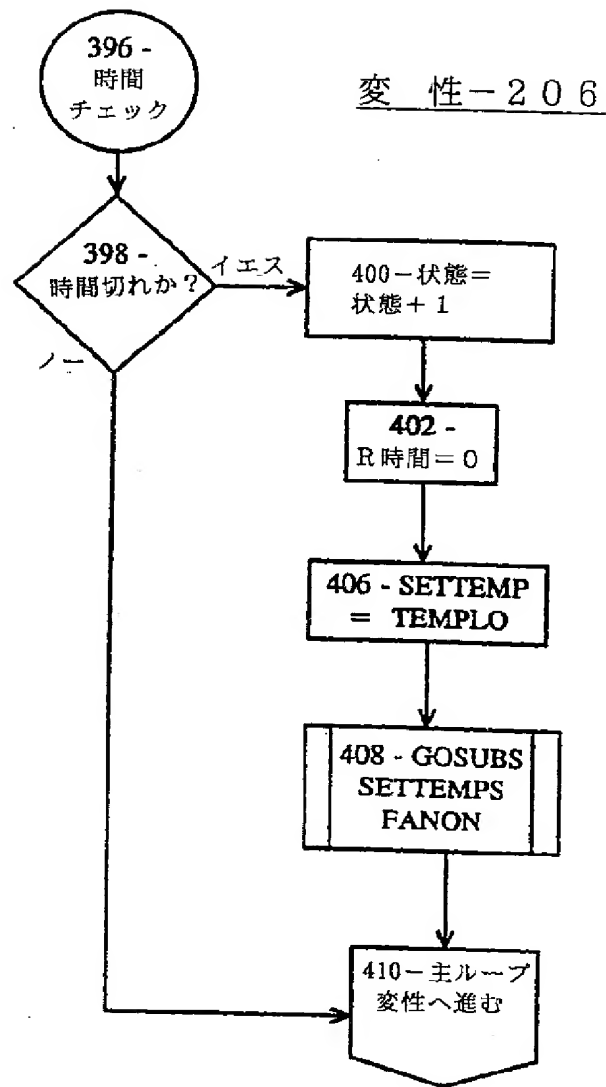


FIG. 9G

【図9】

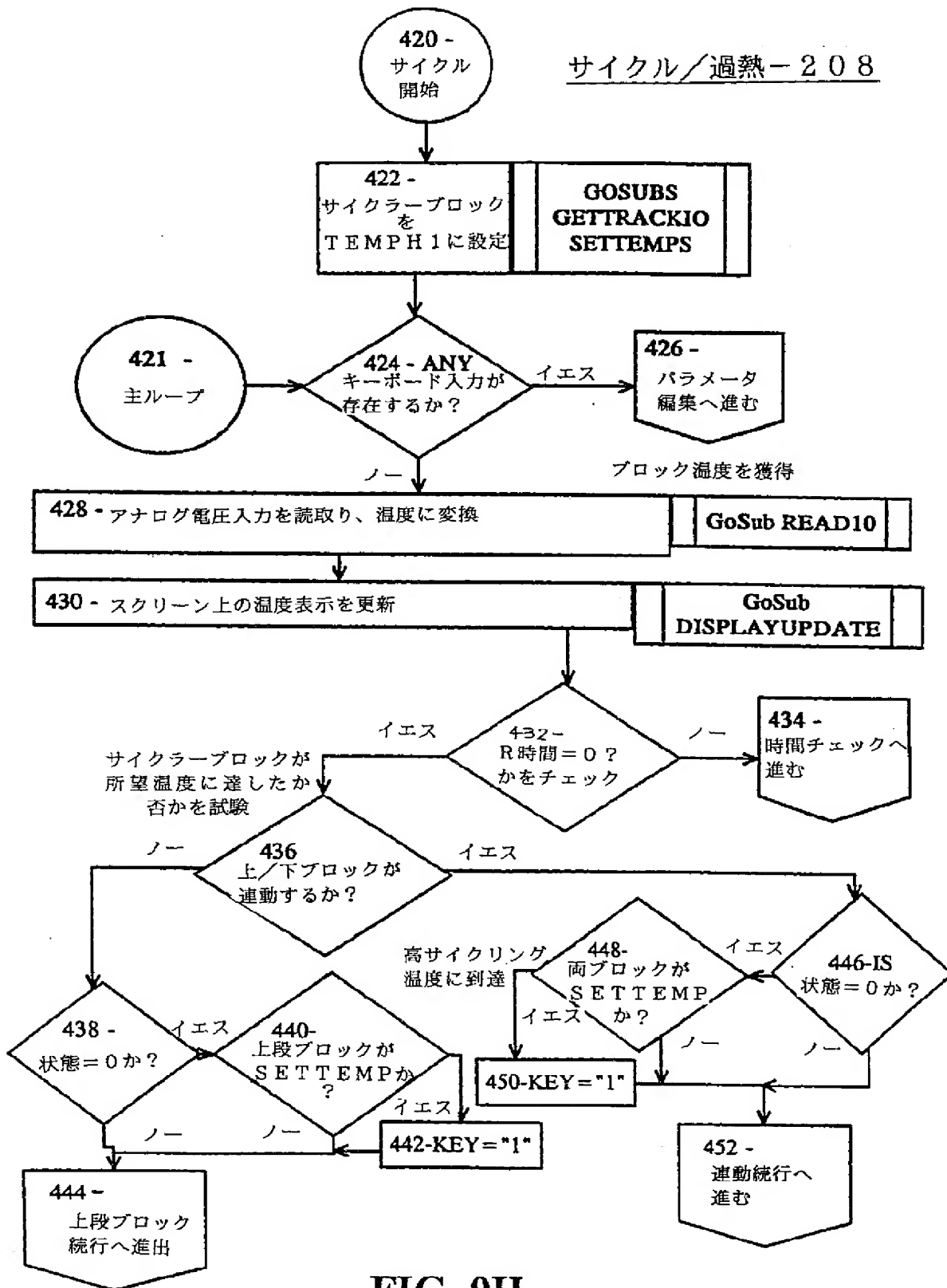
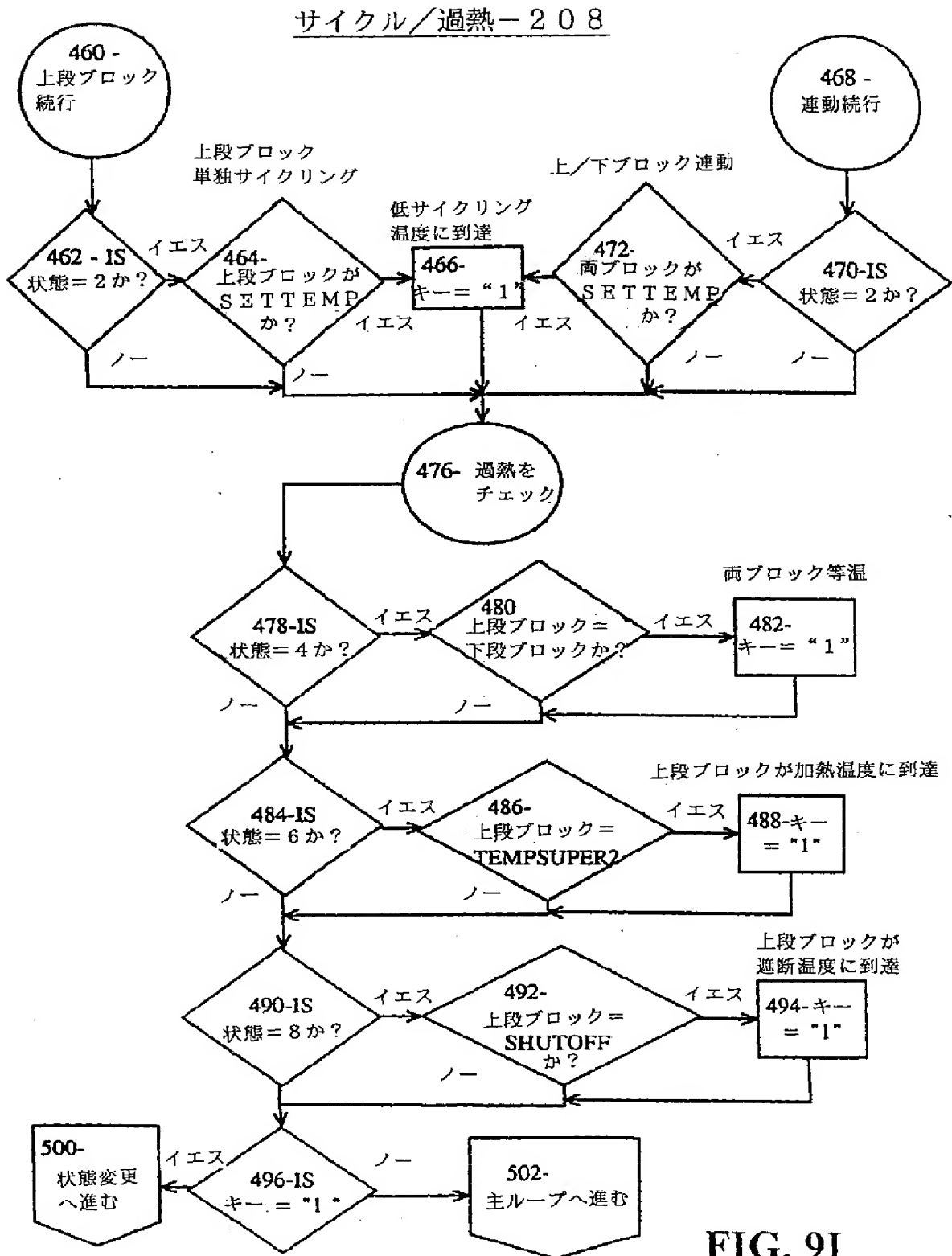


FIG. 9H

【図9】



【図9】

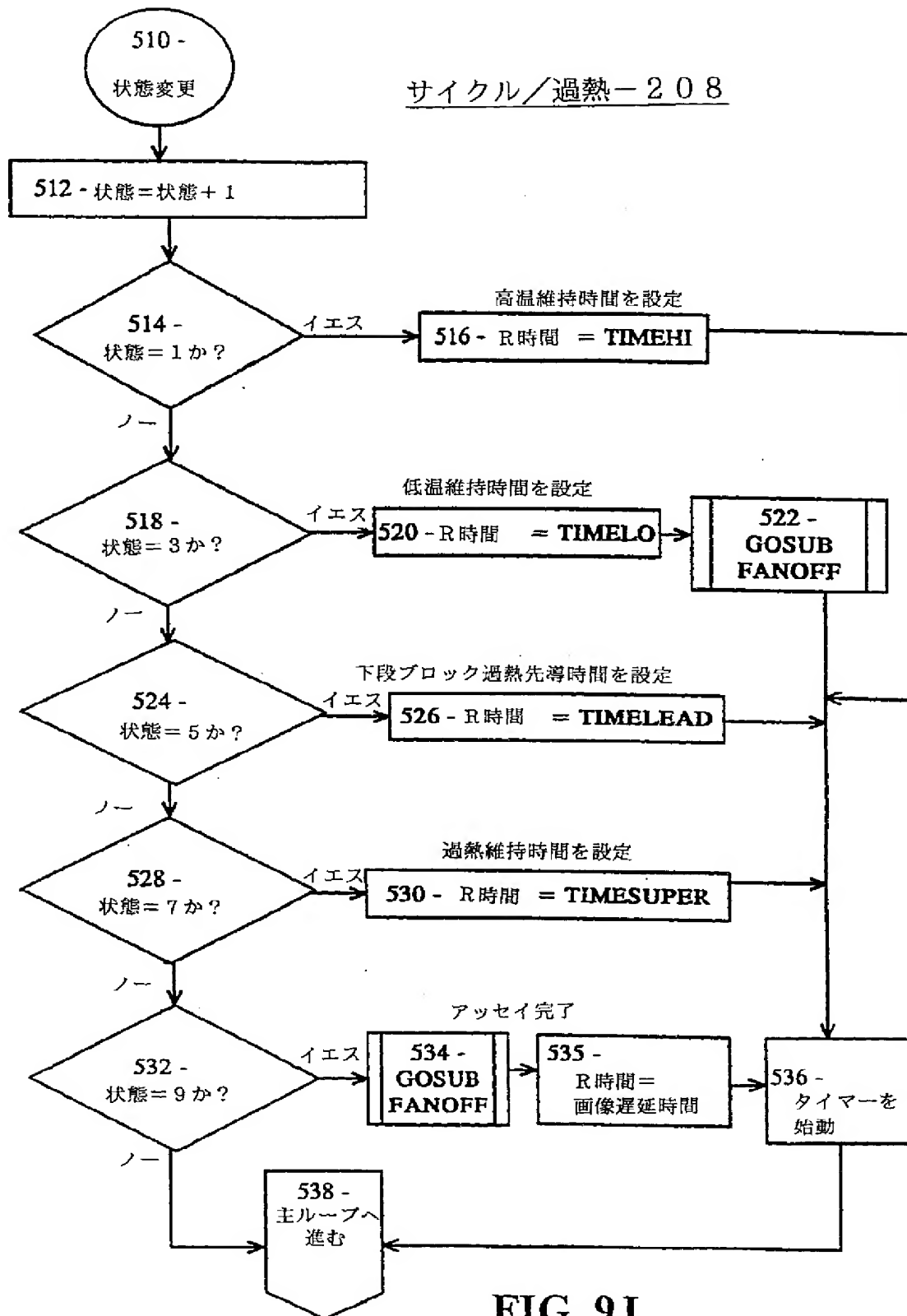


FIG. 9J

【図9】

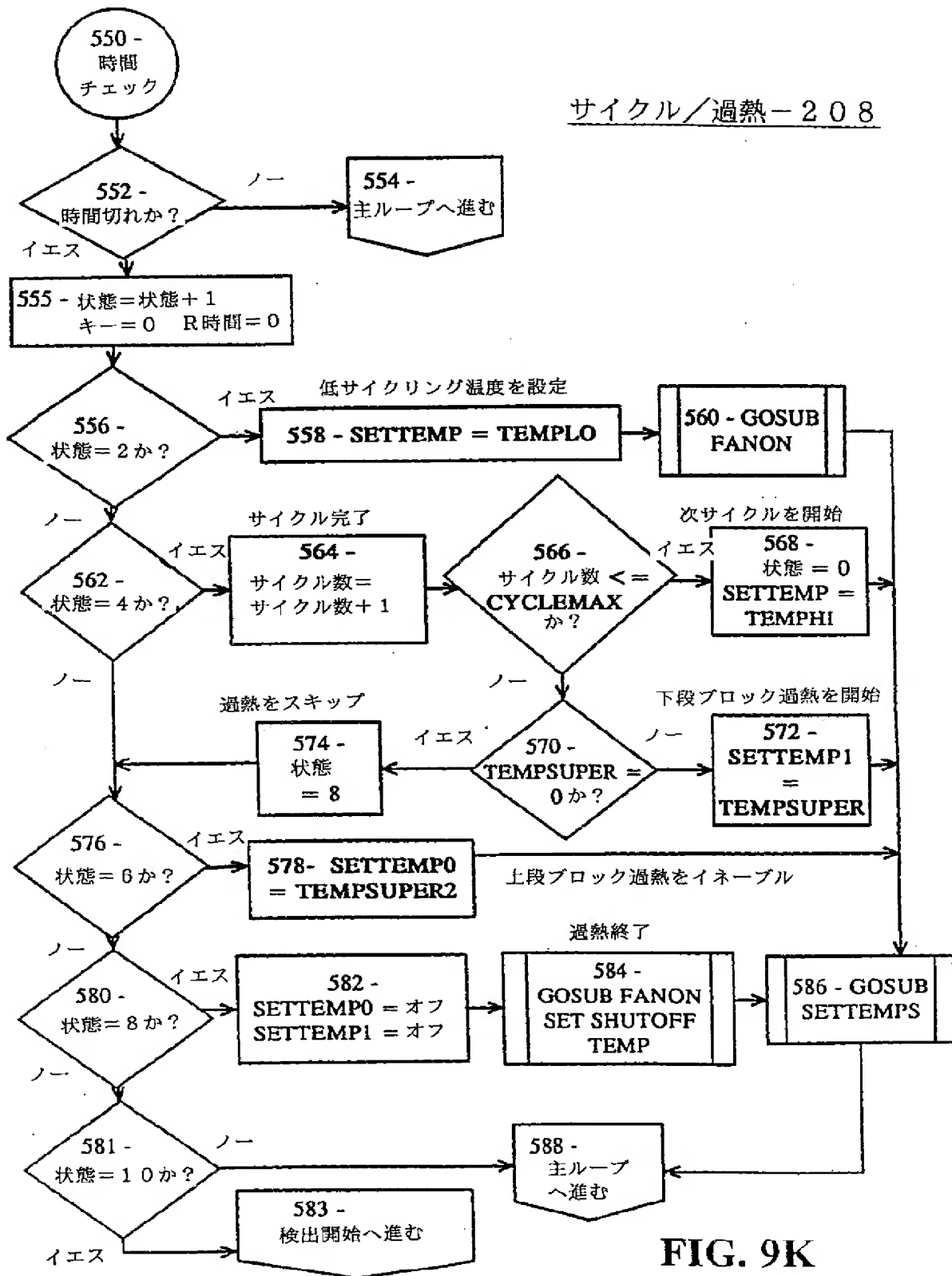


FIG. 9K

【図10】

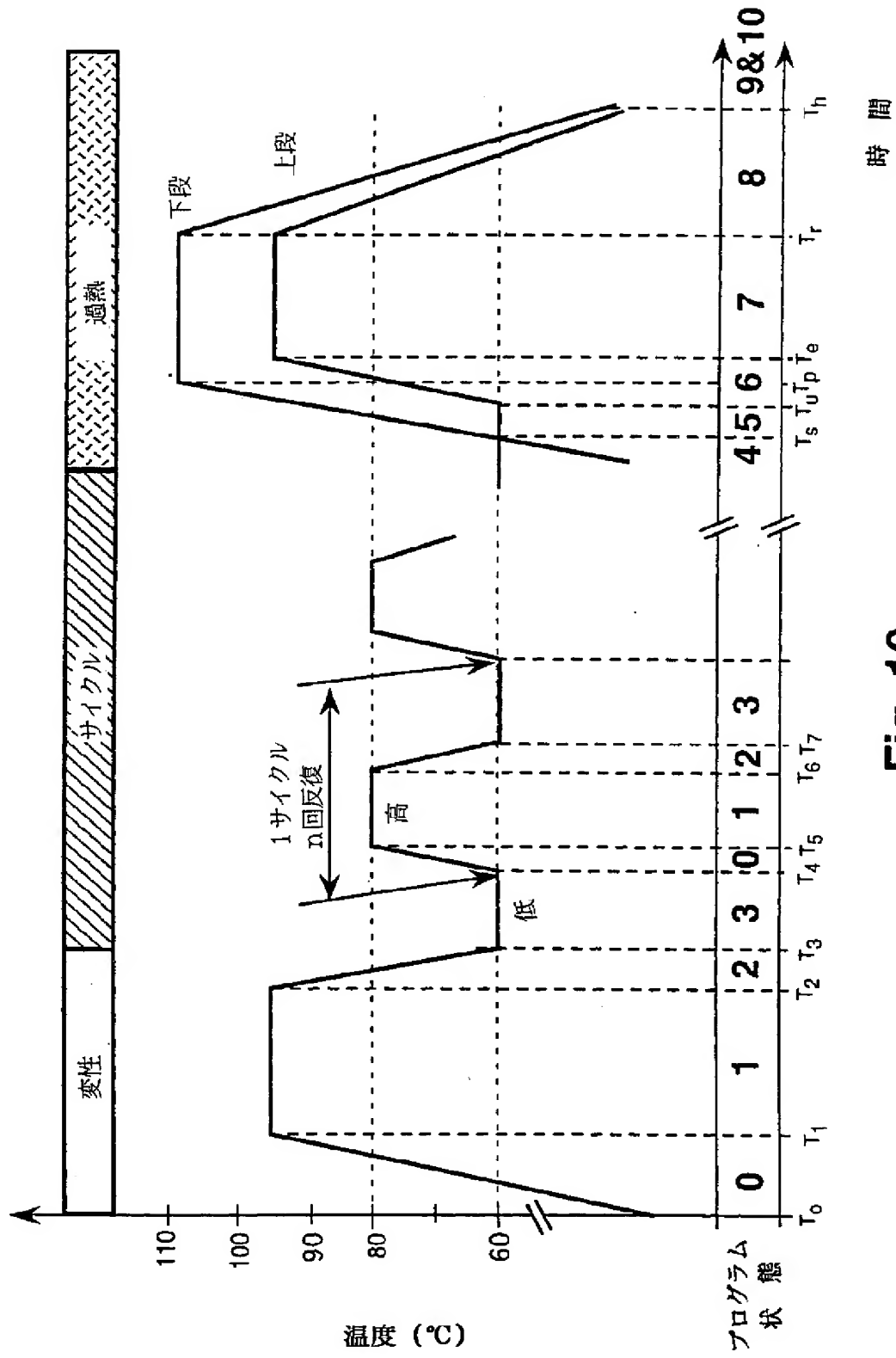
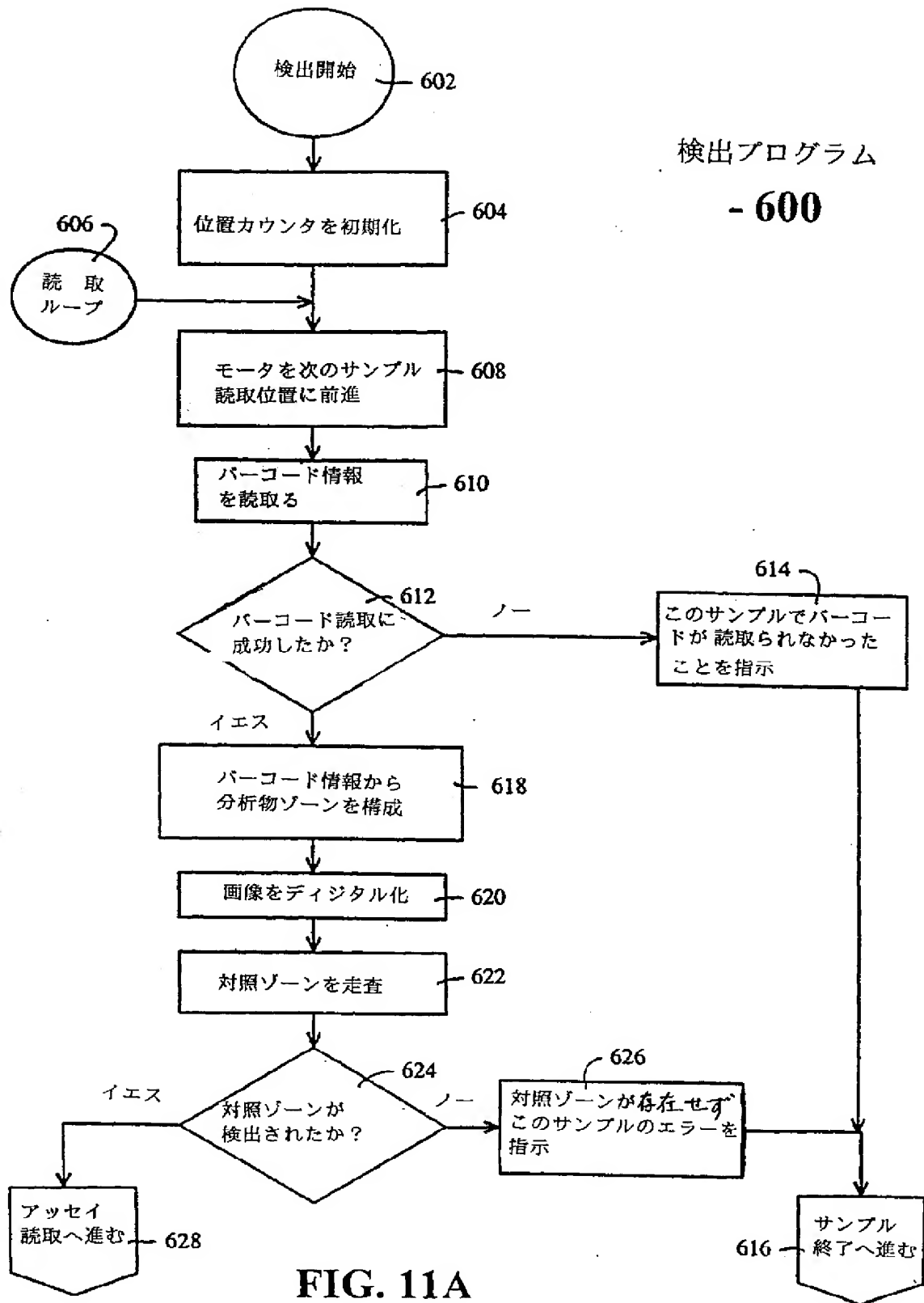


Fig. 10

【図11】



【図11】

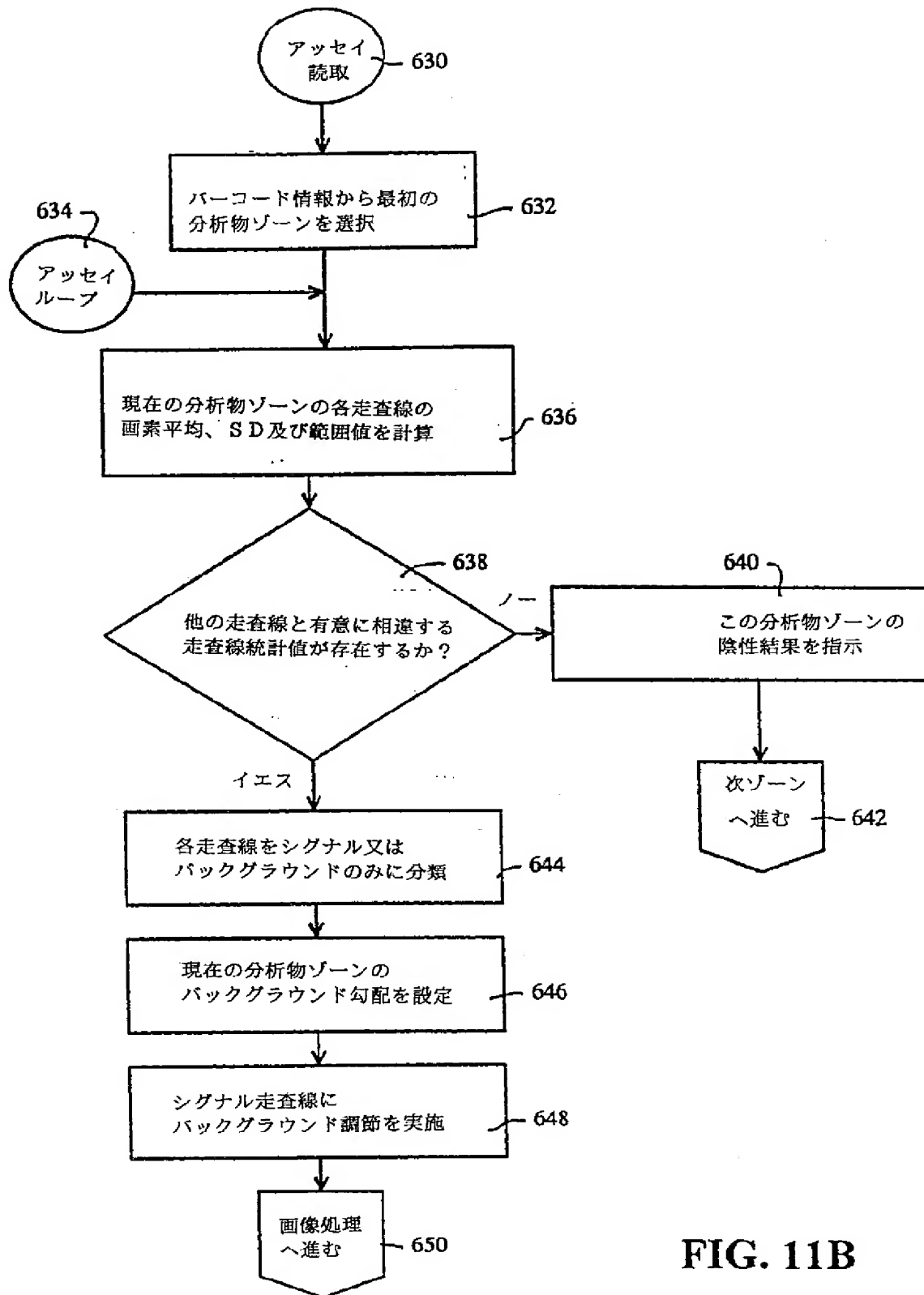


FIG. 11B

【図 1 1】

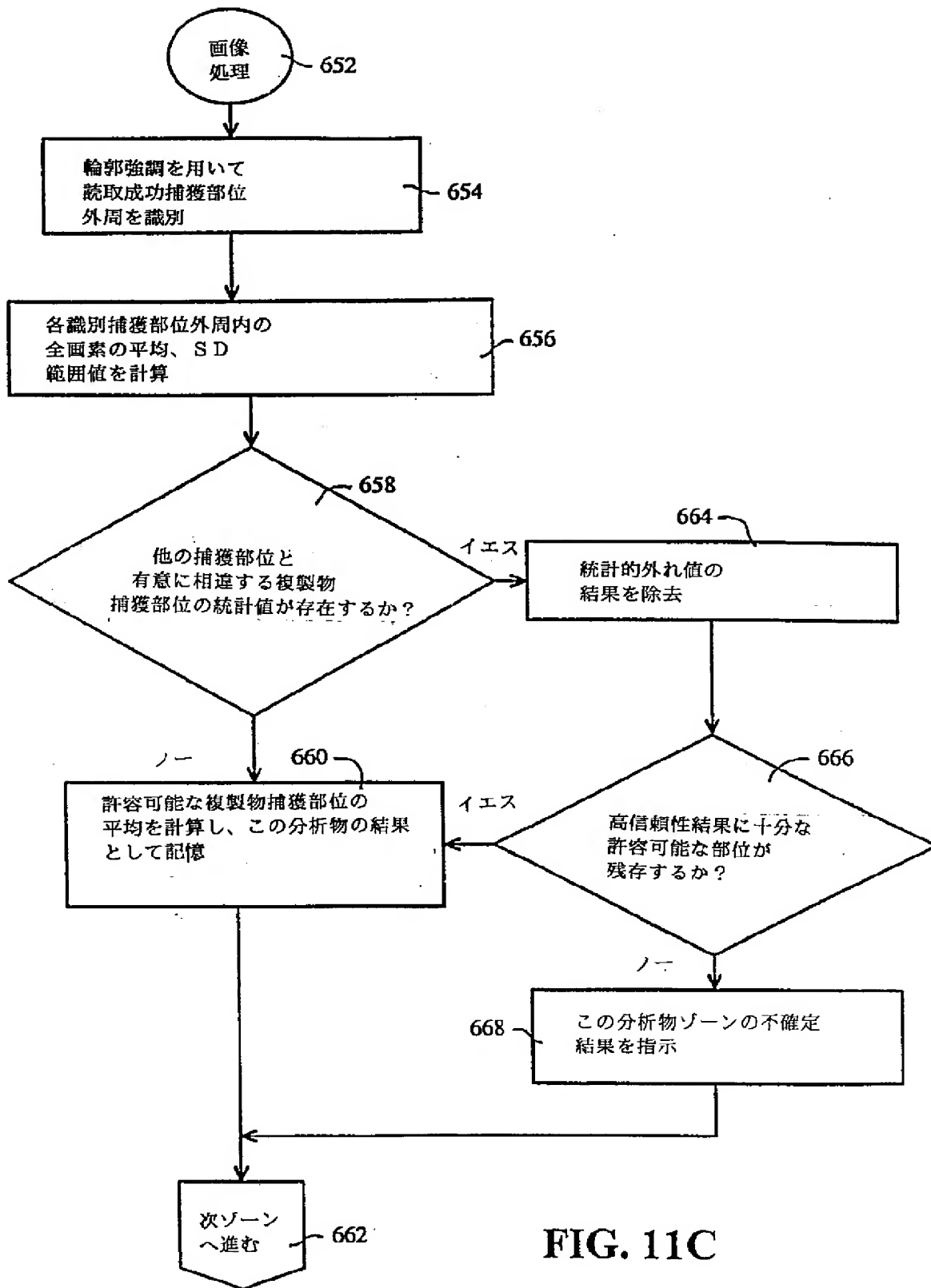


FIG. 11C

【図 11】

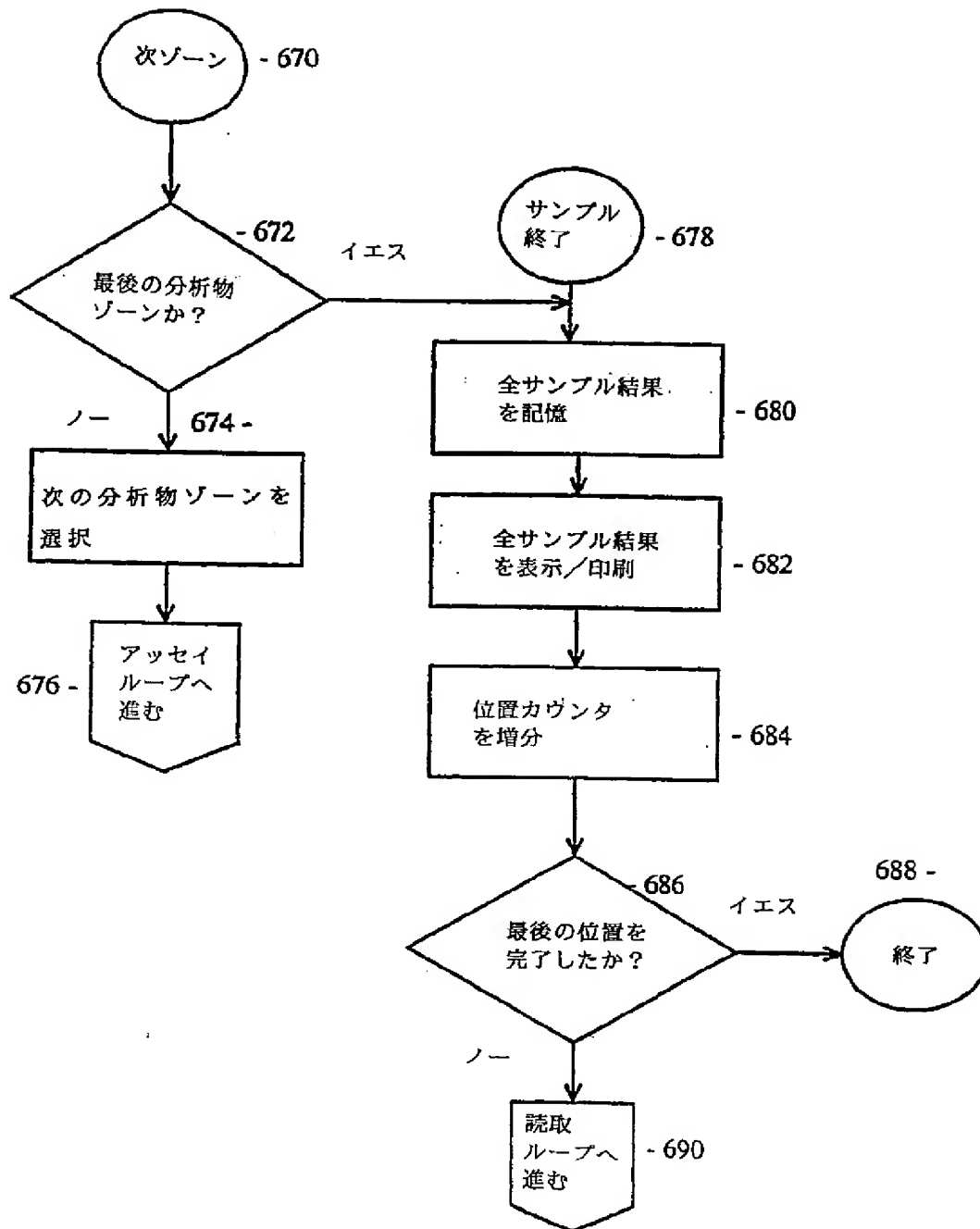


FIG. 11D

【図12A】

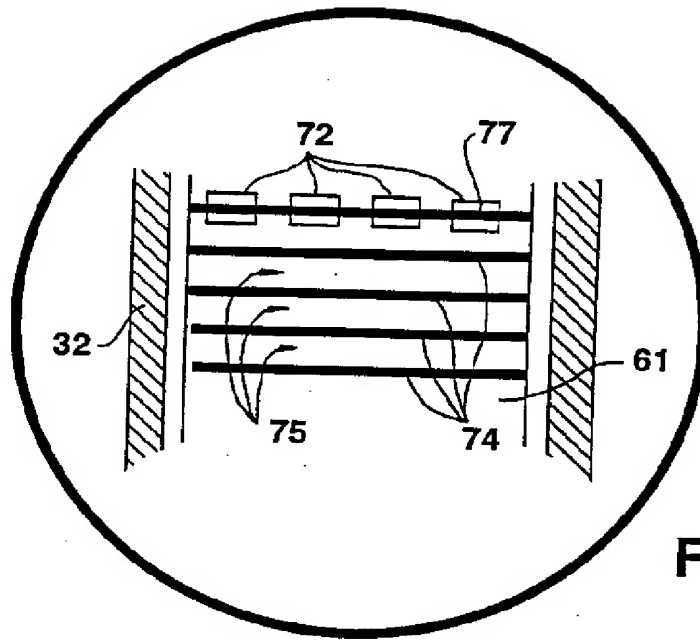


Fig. 12A

【図12】

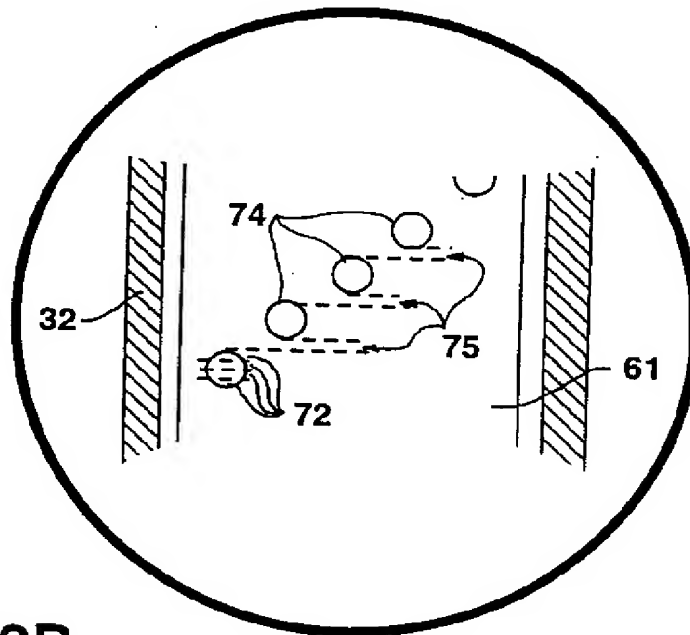


Fig. 12B

【図13】

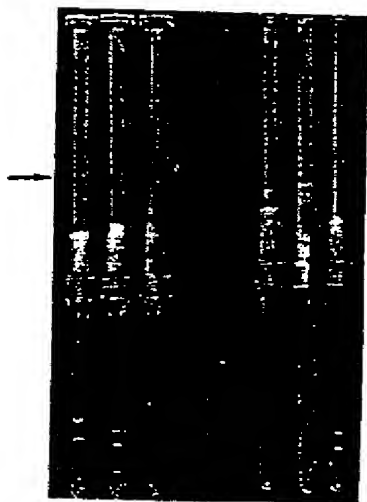


Fig. 13

【図14】

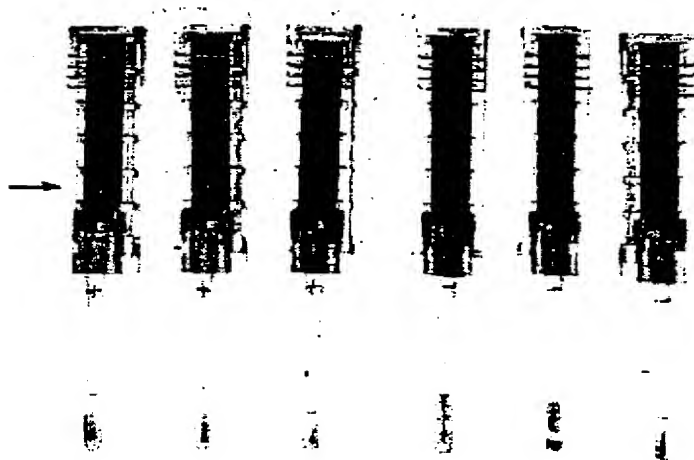


Fig. 14

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N33/50 C12Q1/68		Inter. Appl. No. PCT/US 94/11015
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 514 927 (GILBERT, G.) 25 November 1992 see the whole document ---	1-20
Y	WO,A,93 06486 (LA MINA LTD.) 1 April 1993 see the whole document ---	1
Y	WO,A,92 22801 (ABBOT LABORATORIES US) 23 December 1992 see page 14, paragraph 2; figure 1 see page 23 - page 24, paragraph 2 ---	1-20
Y	EP,A,0 387 696 (ABBOTT LABORATORIES) 19 September 1990 see the whole document ---	1-20
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 January 1995		Date of mailing of the international search report 16.02.95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Osborne, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internat. Application No.
 PCT/US 94/11015

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 461 462 (ABBOTT LABORATORIES) 18 December 1991 see page 4, line 40 - page 5, line 21 ----	1
Y	WO,A,93 20227 (ABBOTT LABORATORIES) 14 October 1993 see page 6 - page 13 ----	1
A	WO,A,92 10588 (AFFYMAX TECHNOLOGIES N.V.) 25 June 1992 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No.
PCT/US 94/11015

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0514927	25-11-92	AU-A-	1999092	30-12-92
		WO-A-	9220824	26-11-92
WO-A-9306486	01-04-93	US-A-	5244815	14-09-93
		AU-A-	2664392	27-04-93
		CA-A-	2118713	01-04-93
WO-A-9222801	23-12-92	AU-A-	2193492	12-01-93
		AU-A-	2250892	12-01-93
		AU-A-	2257592	12-01-93
		AU-A-	2259592	12-01-93
		AU-A-	2266892	12-01-93
		CA-A-	2109944	23-12-92
		EP-A-	0588931	30-03-94
		EP-A-	0588967	30-03-94
		EP-A-	0588968	30-03-94
		EP-A-	0588969	30-03-94
		EP-A-	0588972	30-03-94
		JP-T-	6507495	25-08-94
		JP-T-	6507496	25-08-94
		JP-T-	6507497	25-08-94
		JP-T-	6507498	25-08-94
		JP-T-	6507499	25-08-94
		WO-A-	9222800	23-12-92
		WO-A-	9222879	23-12-92
		WO-A-	9222802	23-12-92
		WO-A-	9222880	23-12-92
		US-A-	5275951	04-01-94
EP-A-0387696	19-09-90	AU-B-	636875	13-05-93
		AU-A-	5119690	20-09-90
		CA-A-	2012355	17-09-90
		JP-A-	2283299	20-11-90
		US-A-	5310650	10-05-94
EP-A-0461462	18-12-91	US-A-	5120662	09-06-92
		AU-A-	7816591	10-10-91
		CA-A-	2043689	05-12-91
		JP-A-	4232465	20-08-92

フロントページの続き

- (72)発明者 コットラリク, ジョン・ジェイ
アメリカ合衆国、イリノイ・60061、バー
ノン・ヒルズ、サウス・オールド・クリー
ク・261
- (72)発明者 ステインプソン, ドナルド・アイ
アメリカ合衆国、イリノイ・60031、ガー
ニー、パイングローブ・ストリート・573
- (72)発明者 ホイジャー, ジョアネル・ブイ
アメリカ合衆国、イリノイ・60004、アー
リントン・ハイツ、ウエスト・リリアン・
アベニュー・111

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成13年11月13日(2001.11.13)

【公表番号】特表平9-504610

【公表日】平成9年5月6日(1997.5.6)

【年通号数】

【出願番号】特願平7-511848

【国際特許分類第7版】

G01N 33/543 595

G06T 7/00

// G01N 21/84

【F I】

G01N 33/543 595

21/84 Z

G06F 15/62 395

手続補正書

平成13年5月31日

特許庁長官 及 料 造 殿

1. 事件の表示 平成7年特許第511848号

2. 補正をする者

名 称 アンボット・ラボラトリーズ

3. 代 理 人 東京都新宿区新宿1丁目1番14号 山田ビル
(郵便番号 160-0022) 電話(03)3354-8623
(0300) 弁理士 川 口 義 雄

4. 補正命令の日付 自 発

5. 補正により増加する請求項の数 なし

6. 補正対象書類名 請求の範囲

7. 補正対象項目名 請求の範囲

8. 補正の内容

(1) 請求の範囲を別紙の通り補正する。

【明 細】

請 求 の 範 囲

1. 各々同一分析物に対して特異的であり且つ各々シグナル領域以外に非シグナル領域を含む複数の検出物検出部位と、分析物の存在又は量を検出可能なシグナルを前記検出部位のシグナル領域で発生する手段を含む固体素子を準備する段階と、

標的分子を含む試料のある反応サンプルに前記固体を露出し、分析物が存在する場合には検出可能なシグナルを前記検出部位で発生させる段階と、

前記検出物検出部位のビデオ画像を作成する段階と、

前記検出物検出部位の各々について前記ビデオ画像のデジタル表現を作成し、前記デジタル表現をコンピュータメモリに記憶させる段階と、

前記デジタル表現を分析し、前記検出可能なシグナルが分析物の存在又は量の尺度として存在するか否かを判定する段階とを備えている装置に係る請求項1に記載の方法。

2. 前記分析段階が、少なくとも一つの検出物部位のデジタル表現を少なくとも一つの他の検出物部位のデジタル表現と比較して前記分析物の結果の信頼性を高めることを含んでいる請求項1に記載の方法。

3. 前記分析段階が、少なくとも一つの検出物部位のデジタル表現を前記分析物の他の各検出物部位のデジタル表現と比較することを含んでいる請求項1に記載の方法。

4. 前記比較が、前記シグナルをバックグラウンドシグナル値に対して正規化することを含んでいる請求項2に記載の方法。

5. 前記デジタル表現が複数の走査線と設定金額の各々のための複数の画素を含む請求項1に記載の方法。

6. 前記分析段階が、検出物部位の二つ以上についてシグナル領域の面積値を比較することを含んでいる請求項5に記載の方法。

7. 検出可能なシグナルをもつ前記検出物検出部位内のシグナル領域の外周を識別するために輪郭強調を使用する段階を含む請求項1に記載の方法。

8．前記複製物シグナル領域が連続又は不連続四角アレー状である請求項1に記載の方法。

9．前記複製物シグナル領域がほぼ円形である請求項1に記載の方法。

10．担体が該担体上の複製物部位の構成に関する光学コード化情報を更に備えており、前記情報がビデオ画像に含まれ、デジタル表現を作成する段階の前に分析される請求項1に記載の方法。